

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ISABELA GOELDNER DA SILVA

CONCENTRAÇÕES SÉRICAS E POLIMORFISMOS DE MBL E MASP-2 EM  
PACIENTES COM ARTRITE REUMATÓIDE E FAMILIARES

CURITIBA  
2013

ISABELA GOELDNER DA SILVA

CONCENTRAÇÕES SÉRICAS E POLIMORFISMOS DE MBL E MASP-2 EM  
PACIENTES COM ARTRITE REUMATÓIDE E FAMILIARES

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Análises Clínicas.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Shirley R. da Rosa Utiyama.

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Iara José de Messias-Reason.

CURITIBA  
2013

Silva, Isabela Goeldner da  
Concentrações séricas e polimorfismo de MBL e MASP-2 em  
pacientes com artrite reumatóide e familiares / Isabela Goeldner da  
Silva - Curitiba, 2013.

163 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm

Orientadora: Professora Dra. Shirley Ramos da Rosa Utiyama  
Coorientadora: Professora Dra. Iara José Messias-Reason  
Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do  
Paraná, 2013. Área de concentração: Análises Clínicas.

Inclui bibliografia

1. MBL. 2. MASP-2. 3. Artrite reumatóide. 4. Sistema  
complemento.  
5. Familiares. I. Utiyama, Shirley Ramos da Rosa. II. Messias-Reason,  
Iara José. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.


CDD 616.7227

# TERMO DE APROVAÇÃO


**ISABELA GOELDNER DA SILVA**

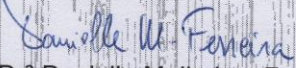
**Título: CONCENTRAÇÕES SÉRICAS E POLIMORFISMOS DE MBL E MASP-2 EM PACIENTES COM ARTRITE REUMATÓIDE E FAMILIARES**


Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Doutor, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Análises Clínicas.

  
Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Shirley Ramos da Rosa Utiyama  
(Orientadora)

  
Prof. Dr. Marcelo Derbli Schafranski  
(Universidade Estadual de Ponta Grossa - UEPG)

  
Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Lilian Pereira Ferrari  
(Faculdades Integradas do Brasil - UniBrasil)

  
Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Danielle Malheiros Ferreira  
(Pontifícia Universidade Católica do Paraná)

  
Prof. Dr. Sérgio O. Ioshii  
(Universidade Federal do Paraná)

Curitiba, 27 de setembro de 2013.

## **AGRADECIMENTOS**

Eu gostaria de agradecer profundamente a todos aqueles que contribuíram de formas variadas e em diferentes níveis para o desenvolvimento dos trabalhos que culminaram na conclusão desse Doutorado.

Agradeço à Prof. Dra. Shirley Ramos da Rosa Utiyama pelos vários anos de orientação e carinho. Obrigada pela dedicação e perfeccionismo, que foram fundamentais para a excelência na execução e conclusão desta tese. Levarei seus ensinamentos e amizade por toda a minha vida.

À Prof. Dra. Iara José de Messias-Reason pela co-orientação deste trabalho. Obrigada também pelas palavras de fé e incentivo, que sempre nos acalmam nos momentos de angústia.

À Dra. Thelma L. Skare e à toda equipe do Serviço de Reumatologia do Hospital Evangélico de Curitiba pela coleta das amostras de pacientes e familiares estudados. Agradeço também pela organização e gentileza com que exercem suas funções no Ambulatório de Reumatologia, o que contribuiu imensamente para a realização deste trabalho.

A conclusão desse Doutorado não teria sido possível sem os conhecimentos e a paciência de minha mentora e amiga Prof. Dra. Angélica B. W. Boldt. Sou muito grata a ela, pela amizade e incentivo na conquista desse Doutorado.

Obrigada ao Prof. Dr. Renato M. Nisihara pela ajuda no planejamento, execução e interpretação dos ensaios de ELISA. Agradeço também pela amizade e ensinamentos desde a iniciação científica.

Às doutorandas Flávia Nass e Stefanie Epp Boschmann pela importante ajuda na execução dos ensaios de ELISA e coleta do grupo controle, respectivamente. Também agradeço à equipe técnica do Laboratório de Imunopatologia Molecular do Hospital de Clínicas pelo apoio e convívio.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, em especial ao Prof. Dr. Roberto Pontarolo, pela dedicação que tem ao Programa e aos alunos nele matriculados.

Agradeço a disponibilidade e a avaliação deste trabalho pelos membros da Banca Examinadora, cujas críticas e sugestões foram ferramentas de lapidação precisa e criteriosa, na estruturação e desfecho desta tese.

Obrigada a todos os amigos que comigo dividem as dependências do laboratório de Imunopatologia Molecular do HC-UFPR, onde vivenciamos a satisfação e as angústias inerentes ao exercício da prática científica. Em especial, obrigada à Dra. Paola Rosa Luz e à mestranda Karla Almeida pelo companheirismo e pelas palavras de otimismo e incentivo sempre que algo não ia bem. Sentirei muita falta de todos vocês!

Não poderia deixar de agradecer aos meus colegas do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de Tübingen, em especial ao Prof. Dr. Jürgen F. Kun (*in memoriam*) por ter aceitado prontamente orientar parte desse trabalho e pelo curto, porém proveitoso, período de convívio. Agradeço também ao Dr. Thirumalaisamy P. Velavan, por toda ajuda prestada durante meu estágio científico na Alemanha.

Obrigada aos meus pais, Clarinda e Sergio, pelo amor incondicional e dedicação sem os quais eu não teria chegado até aqui. É por vocês que concluo esta tese com tanta alegria, podendo assim retribuir um pouco do orgulho que sinto de vocês. Obrigada à minha irmã, Juliana, por ser minha companheira de todas as horas e por me incentivar a ir além do que eu julgava ser capaz.

Zum Schluss möchte ich mich bei meinem Freund Peter für die Liebe und grenzenlose Geduld bedanken. Lass uns einfach glücklich sein!

*"A criação prossegue incessantemente por meio do homem, mas o homem não cria, descobre."*

(Gaudí)

## RESUMO

A artrite reumatóide (AR) é uma doença autoimune inflamatória que afeta aproximadamente 1% da população mundial e possui elevado impacto socioeconômico. A lectina ligante de manose (MBL) e a serina protease 2 associada à MBL (MASP-2) fazem parte da via das lectinas do sistema complemento e são proteínas-chaves na manutenção da homeostasia do organismo. As concentrações séricas de MBL e MASP-2 são reguladas por polimorfismos de nucleotídeo único nos genes *MBL2* e *MASP2*, respectivamente. Concentrações séricas e polimorfismos de MBL já foram associados à suscetibilidade e prognóstico para a AR em algumas populações. Investigações sobre o papel de MASP-2 na AR são escassas. O presente estudo objetivou investigar as concentrações séricas de MBL e MASP-2, e os polimorfismos de *MBL2* e *MASP2* em pacientes com AR e familiares e verificar a associação com aspectos clínicos da doença. Foram estudados 209 pacientes com AR, 200 familiares de pacientes e 421 indivíduos sadios. Os polimorfismos -221 (H/L) e -550 (X/Y), presentes no promotor de *MBL2*, +4 (P/Q) na região 5' não traduzida e as variantes A/D/B/C do exon 1 foram investigados através de sequenciamento gênico. Também foram investigados os polimorfismos presentes no promotor (-175C>A) e nos exons 3 (p.R99Q, p.D120G, p.P126L), 10 (p.D371Y, p.V377A) e 12 (p.R439H), e no intron 9 (+16060C>T) do gene *MASP2*, por meio de PCR, utilizando sequências específicas de iniciadores. As concentrações séricas de MBL e MASP-2 foram quantificadas por meio de ELISA. Foi observada associação entre concentrações diminuídas de MBL e MASP-2 e o desenvolvimento da AR em nosso meio (P=0,004 e P<0,0001, respectivamente). O haplótipo *LYPB* para *MBL2* apresentou associação com o risco de desenvolvimento da doença (OR=1,28 [95%IC1,04-1,60] P=0,018), enquanto haplótipos *LXPA* foram mais frequentes em pacientes anti-CCP positivos (OR=2,42 [95%IC1,04-5,60] P=0,036). Os haplótipos \*2A1 e \*2B1 apresentaram associação com risco aumentado para AR para *MASP2* (OR=6,0 [95%IC1,27-28,6] P=0,02; OR=2,2 [95%IC1,29-3,6], P=0,004, respectivamente). As variantes p.120G e p.439H de *MASP2* aumentaram em 5,13 vezes o risco de sintomas articulares em familiares de pacientes com AR (P=0,02), sendo que familiares com sintomas articulares sugestivos da doença apresentaram concentrações significativamente reduzidas de MASP-2 (P=0,0022). Por sua vez, concentrações baixas de MBL mostraram associação com ocorrência de abortos e infecções recorrentes em pacientes com AR (P=0,0021 e P=0,0206, respectivamente). Os resultados obtidos permitem sugerir que a genotipagem dos polimorfismos de *MBL2* e *MASP2*, bem como as concentrações séricas de MBL e MASP-2 podem representar futuras ferramentas como biomarcadores para a AR.

Palavras-chave: Artrite reumatóide. MBL. MASP-2. Familiares. Sistema complemento. Concentração. Polimorfismo.



## ABSTRACT

Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune inflammatory disease, which affects around 1% of world's population and has a significant socio-economic impact. Mannose-binding lectin (MBL) and MBL-associated serine protease 2 (MASP-2) are proteins of the lectin pathway of the complement system and have a key-role on body's homeostasis. MBL and MASP-2 serum levels are genetically determined by polymorphisms at the *MBL2* and *MASP2* gene, respectively. Polymorphisms and serum concentrations of MBL were already related to RA susceptibility and prognosis in some populations. Investigations on the role of MASP-2 on RA are absent. The present study aimed to investigate MBL and MASP-2 serum concentrations and polymorphisms in RA patients and their relatives and to relate the findings to RA clinical presentation. Two-hundred nine RA patients, 200 relatives and 421 healthy controls were studied. *MBL2* polymorphisms -221 (H/L) -550 (X/Y), in the promoter, +4 (P/Q) in the 5' non-translated region and the variants A/D/B/C in the exon 1 were investigated by sequencing. Polymorphisms in the promoter (-175C>A) and exons 3 (p.R99Q, p.D120G, p.P126L), 10 (p.D371Y, p.V377A) and 12 (p.R439H), and intron 9 (+16060C>T) at the *MASP2* gene were investigated by PCR sequence specific primer. MBL and MASP-2 serum concentrations were determined by ELISA. Low MBL and MASP-2 concentrations were related to RA development (P=0,004 and P<0,0001, respectively). The haplotype *LYPB* was associated to higher risk for RA (OR=1,28 [CI95%1,04-1,60] P=0,018) while *LXPA* was more frequent in anti-CCP positive patients (OR=2,42 [CI95%1,04-5,60] P=0,036). Similarly, the *MASP2* haplotypes \*2A1 and \*2B1 were associated with increased risk for RA (OR=6,0 [CI95%1,27-28,6] P=0,02; OR=2,2 [CI95%1,29-3,6] P=0,004, respectively). The low-producing *MASP2* variants p.120G and p.439H increased in 5.13 times the risk for articular symptoms in relatives from RA patients (P=0,02). In the other hand, relatives with articular symptoms presented lower MASP-2 levels (P=0,0022). Low MBL serum concentrations were associated with miscarriage and recurrent infections in RA patients (P=0,0021 and P=0,0206, respectively). In conclusion, our results lead us to suggest that *MBL2* and *MASP* polymorphisms, as well as MBL and MASP-2 serum levels, may be future biomarkers for RA.

Keywords: Rheumatoid arthritis. MBL. MASP-2. Relatives. Complement system. Level. Polymorphism.

## LISTA DE FIGURAS E QUADROS

FIGURA 1 -	“AS TRÊS GRAÇAS” DE PETER PAUL RUBENS.....	18
FIGURA 2 -	LINHA DO TEMPO ATÉ A MANIFESTAÇÃO CLÍNICA DA AR.....	20
FIGURA 3 -	ARTICULAÇÃO NORMAL E NA ARTRITE REUMATÓIDE.....	23
FIGURA 4 -	MECANISMO DA INFLAMAÇÃO NA ARTRITE REUMATÓIDE.....	24
FIGURA 5 -	FUNÇÕES DO TNF- $\alpha$ NA ARTRITE REUMATÓIDE.....	25
FIGURA 6 -	ATIVAÇÃO DO SISTEMA COMPLEMENTO PELA VIA DAS LECTINAS.....	36
FIGURA 7 -	ESTRUTURA E ORGANIZAÇÃO MOLECULAR DA MBL.....	38
FIGURA 8 -	POLIMORFISMOS DO GENE <i>MBL2</i> E LOCALIZAÇÃO NA PROTEÍNA.....	40
FIGURA 9 -	POLIMORFISMOS DO GENE <i>MASP2</i> E LOCALIZAÇÃO NA PROTEÍNA.....	47
FIGURA 10 -	OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS NA GENOTIPAGEM DE <i>MBL2</i> .....	58
FIGURA 11 -	CONDIÇÕES UTILIZADAS PARA A PCR DE AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO PROMOTORA DE <i>MBL</i> .....	59
FIGURA 12 -	PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO PROMOTORA DE <i>MBL</i> .....	59
FIGURA 13 -	CONDIÇÕES PARA A REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO DE <i>MBL2</i> ..	61
FIGURA 14 -	PADRÕES ELETROFORÉTICOS DAS PCRs-SSP PARA <i>MASP2</i> .....	65
FIGURA 15 -	RECOMBINAÇÃO ENTRE OS HAPLÓTIPOS *2B2A-i e *1B1-h DE <i>MASP2</i> .....	79
QUADRO 1 -	NOMENCLATURA DOS HAPLÓTIPOS DE <i>MBL2</i> .....	41
QUADRO 2 -	FREQUÊNCIA DOS SNPS DE <i>MASP2</i> EM DIFERENTES POPULAÇÕES.....	49

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	CRITÉRIOS CLASSIFICATÓRIOS PARA ARTRITE REUMATÓIDE – ACR/ LIGA EUROPÉIA CONTRA REUMATISMO, 2010.....	29
TABELA 2 -	DADOS CLÍNICOS DOS PACIENTES COM AR.....	53
TABELA 3 -	DADOS CLÍNICOS E SOROLÓGICOS DOS FAMILIARES.....	54
TABELA 4 -	SEQÜÊNCIAS DE INICIADORES PARA GENOTIPAGEM DE <i>MASP2</i> .....	63
TABELA 5 -	DISTRIBUIÇÃO E COMPARAÇÃO DOS HAPLÓTIPOS DE <i>MBL2</i> (N [%]) EM PACIENTES, FAMILIARES E CONTROLES.....	69
TABELA 6 -	DISTRIBUIÇÃO E COMPARAÇÃO DOS GENÓTIPOS E ALELOS DO EXON 1 DE <i>MBL2</i> (N [%]) EM PACIENTES, FAMILIARES E CONTROLES.....	70
TABELA 7 -	FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS DE <i>MBL2</i> (N [%]) EM PACIENTES E FAMILIARES DE ACORDO COM CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E SOROLÓGICAS.....	72
TABELA 8 -	NOMENCLATURA DOS HAPLÓTIPOS DE <i>MASP2</i> E RESPECTIVAS FREQUÊNCIAS (%) EM PACIENTES COM AR, FAMILIARES E CONTROLES.....	81
TABELA 9 -	REGRESSÃO LOGÍSTICA BINÁRIA PARA O RISCO DE ARTRITE REUMATÓIDE PACIENTES VS. CONTROLES.....	82
TABELA 10 -	FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS DE <i>MASP2</i> (%) EM PACIENTES E FAMILIARES DE ACORDO COM CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS.....	84
TABELA 11 -	REGRESSÃO LOGÍSTICA BINÁRIA PARA O RISCO DE ARTRITE REUMATÓIDE E SINTOMAS ARTICULARES EM FAMILIARES.....	85
TABELA 12 -	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE PACIENTES E FAMILIARES DE ACORDO COM AS CONCENTRAÇÕES DE MASP-2.....	90

## LISTA DE GRAFICOS

GRÁFICO 1 -	CONCENTRAÇÕES DE MBL NOS GRUPOS EM ESTUDO.....	73
GRÁFICO 2 -	DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS ESTUDADOS DE ACORDO COM A CONCENTRAÇÃO DE MBL.....	74
GRÁFICO 3 -	DISTRIBUIÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE MBL EM RELAÇÃO AOS DIFERENTES HAPLÓTIPOS DE <i>MBL2</i> .....	75
GRÁFICO 4 -	DISTRIBUIÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE MBL EM RELAÇÃO AOS DIFERENTES DIPLÓTIPOS DE <i>MBL2</i> .....	76
GRÁFICO 5 -	CONCENTRAÇÕES DE MBL EM PACIENTES E FAMILIARES DE ACORDO COM CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS.....	78
GRÁFICO 6 -	CONCENTRAÇÕES DE MASP-2 NOS GRUPOS EM ESTUDO.....	86
GRÁFICO 7 -	GRUPOS EM ESTUDO DE ACORDO COM AS CONCENTRAÇÕES DE MASP-2.....	87
GRÁFICO 8 -	GENÓTIPOS DE <i>MASP2</i> DISTRIBUÍDOS DE ACORDO COM O PERFIL DE PRODUÇÃO DA PROTEÍNA SÉRICA.....	88
GRÁFICO 9 -	CONCENTRAÇÕES DE MASP-2 EM FAMILIARES COM E SEM SINTOMA ARTICULAR EM RELAÇÃO AOS DEMAIS GRUPOS....	91

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a.C.	- Antes de Cristo
d.C.	- Depois de Cristo
AIDS	- Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
AR	- Artrite reumatóide
Anti-CCP	- Anticorpo Anti-peptídeo Cíclico Citrulinado
dNTP	- Desoxinucleotídeo trifosfatado
DRC	- Domínio de reconhecimento de carboidratos
DAI	- Doença autoimune
DMARD	- Drogas antirreumáticas modificadoras de doença
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
ELISA	- Imunoensaio enzimático
EDTA	- Ácido etilenodiamino tetra-acético
EULAR	- <u>E</u> uropean <u>L</u> ea <u>g</u> ue <u>A</u> gainst <u>R</u> heumatism/Liga Europeia contra Reumatismo
FR	- Fator reumatóide
HLA	- Antígeno leucocitário humano
IgA	- Imunoglobulina do tipo A
IgG	- Imunoglobulina do tipo G
IgM	- Imunoglobulina do tipo M
IL	- Interleucina
IQR	- <u>I</u> nter <u>q</u> uartile <u>R</u> ange/ Intervalo interquartil
kDa	- Quilodaltons
MAC	- <u>M</u> embrane <u>A</u> ttack <u>C</u> omplex/Complexo de ataque à membrana
MBL	- <u>M</u> annan <u>B</u> inding <u>L</u> ectin/Lectina ligante de manose
MBL2	- Gene codificador da proteína ligante de manose 2
MAP19	- <u>M</u> BL- <u>a</u> ssociated <u>p</u> rotein of <u>19</u> kDa/Proteína de 19 kDa associada à MBL
MASP	- <u>M</u> BL- <u>A</u> ssociated <u>S</u> erine <u>P</u> rotease/Serina protease associada à MBL
NK	- Célula <i>natural killer</i>
pb	- Pares de base
PCR	- <u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction/Reação em cadeia da polimerase
SE	- <u>S</u> hared <u>E</u> pitope/Epítipo compartilhado
SNP	- <u>S</u> ingle <u>N</u> ucleotide <u>P</u> olymorphism/Polimorfismo de nucleotídeo único
SSP	- <u>S</u> equence <u>S</u> pecific <u>P</u> rimer/Iniciador sequência específico
STAT	- <u>S</u> ignal <u>T</u> ransduction <u>A</u> nd <u>T</u> ranscription /Sinal ativador de transcrição
Th	- Célula T auxiliar
TNF- $\alpha$	- <u>T</u> umor <u>n</u> ecrosis <u>f</u> actor $\alpha$ /Fator de necrose tumoral $\alpha$
VHS	- Velocidade de hemossedimentação
VL	- Via das lectinas

## LISTA DE SÍMBOLOS

®	- Marca registrada
$\Delta$	- Variação
$\emptyset$	- Média

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2 HIPÓTESE.....</b>	<b>16</b>
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>17</b>
3.1 OBJETIVO GERAL.....	17
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
<b>4 REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>18</b>
4.1 ARTRITE REUMATÓIDE.....	18
4.1.1 Fatores de patogenicidade na artrite reumatóide .....	19
4.1.2 Fisiopatogenia da Artrite Reumatóide .....	22
4.1.3 Manifestações clínicas .....	27
4.1.4 Diagnóstico e acompanhamento .....	28
4.1.5 Autoanticorpos na Artrite Reumatóide.....	30
4.1.6 Tratamento da Artrite Reumatóide .....	32
4.2 FAMILIARES DE PACIENTES COM ARTRITE REUMATÓIDE.....	33
4.3 O SISTEMA COMPLEMENTO .....	34
4.3.1 Aspectos gerais.....	34
4.3.2 Vias de ativação .....	36
4.4 PROTEÍNA LIGANTE DE MANOSE (MBL) .....	37
4.4.1 Aspectos gerais.....	37
4.4.2 Estrutura e funções .....	37
4.4.3 Polimorfismos do gene <i>MBL2</i> .....	39
4.4.3.1 Nomenclatura dos haplótipos de <i>MBL2</i> .....	41
4.4.4 Polimorfismos de <i>MBL2</i> e implicações clínicas .....	42
4.4.5 A MBL na Artrite Reumatóide.....	43
4.5 SERINA PROTEASE ASSOCIADA À MBL (MASP) .....	45
4.5.1 Aspectos gerais.....	45
4.5.2 Estrutura e funções .....	45
4.5.3 Polimorfismos do gene <i>MASP2</i> .....	47
4.5.4 Polimorfismos de <i>MASP2</i> e implicações clínicas .....	49
4.5.5 MASP-2 na Artrite Reumatóide .....	51
<b>5 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>51</b>

5.1	APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA .....	51
5.2	CLASSIFICAÇÃO DO TIPO DE PESQUISA .....	52
5.3	POPULAÇÃO E AMOSTRA DA PESQUISA .....	52
5.3.1	Pacientes.....	52
5.3.2	Familiares de pacientes com artrite reumatóide .....	54
5.3.3	Grupo controle.....	54
5.4	MÉTODOS.....	55
5.4.1	Coleta de sangue .....	55
5.4.2	Quantificação da MBL sérica.....	56
5.4.3	Genotipagem de <i>MBL2</i> .....	57
5.4.4	Quantificação de MASP-2 plasmática .....	61
5.4.5	Genotipagem de <i>MASP2</i> .....	62
5.4.6	Análise estatística .....	65
<b>6</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>67</b>
6.1	<i>MBL2</i> .....	67
6.1.1	Frequências alélicas, haplotípicas e genotípicas .....	67
6.1.2	Associação entre haplótipos de <i>MBL2</i> e características clínicas e sorológicas de pacientes com AR e familiares .....	71
6.1.3	Concentrações séricas de MBL nos grupos em estudo .....	73
6.1.4	Associação entre concentrações de MBL e características clínicas e sorológicas de pacientes com AR e familiares .....	76
6.2	MASP-2 .....	79
6.2.1	Frequências alélicas, haplotípicas e genotípicas .....	79
6.2.2	Associação entre haplótipos de <i>MASP2</i> e características clínicas e sorológicas de pacientes com AR e familiares .....	83
6.2.3	Concentrações séricas de MASP-2 nos grupos em estudo .....	86
6.2.4	Associação entre concentrações de MASP-2 e características clínicas e sorológicas de pacientes com AR e familiares .....	89
6.2.5	Associação entre MBL e MASP-2 .....	91
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>92</b>
7.1	MBL .....	92
7.2	MASP-2 .....	96
<b>8</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>101</b>

**REFERÊNCIAS.....102**

**APÊNDICES .....120**

**ANEXOS .....161**



## 1 INTRODUÇÃO

As doenças autoimunes (DAI) são distúrbios inflamatórios sistêmicos ou órgão específicos que influenciam negativamente a qualidade e a expectativa de vida dos pacientes, tendo em vista seu caráter progressivo e crônico. A magnitude do impacto dessas doenças não se restringe apenas ao âmbito clínico, estendendo-se também à saúde pública e refletindo de maneira acentuada na conjuntura socio-econômica.

A artrite reumatóide (AR) é considerada uma DAI comum, afetando aproximadamente 1% da população mundial (SILMAN E PEARSON 2002). No Brasil, o estudo de Marques et al. (1993) revelou prevalência entre 0,2% a 1%, variando de acordo com a região estudada. A doença é caracterizada por inflamação crônica envolvendo múltiplas articulações, sendo frequente o envolvimento extra-articular. Complicações cardiovasculares, pulmonares, bem como o desenvolvimento de nódulos reumatóides estão entre suas manifestações extra-articulares (DEL RINCÓN et al., 2001; TURESSON, 2013).

Devido à elevada morbimortalidade, a intervenção terapêutica precoce na AR é fundamental. Estratégias visando definir grupos de risco são essenciais diante das controvérsias sobre os fatores que influenciam na evolução clínica da doença (WOUDE et al., 2010).

A elucidação dos processos imunopatológicos envolvidos na AR é relevante não somente para ampliar o entendimento da sua patogênese, bem como para aperfeiçoar os métodos terapêuticos existentes. Neste contexto, torna-se essencial tanto o reconhecimento de biomarcadores prognósticos, como o desenvolvimento de medidas voltadas à modificação da história natural da doença, o que proporcionará inúmeros benefícios aos milhões de pacientes com AR.

Há anos autoanticorpos são utilizados como marcadores diagnósticos e prognósticos para a AR. Dentre eles, já está bem estabelecido o valor do fator reumatóide (FR) e do anticorpo antipeptídeo cíclico citrulinado (anti-CCP) na prática clínica (ALETAKHA et al., 2010).

O sistema complemento (SC) é um dos mecanismos efetores da imunidade inata, que desempenha papel importante na fisiopatologia da AR. Sua ativação

envolve um grande número de proteínas e pode se dar através de três vias: clássica, alternativa e das lectinas.

A proteína ligante de manose (MBL) é o componente central da via das lectinas. Através de sua ligação a açúcares como manose, fucose, glicose e N-acetil-D glucosamina presentes na superfície de micro-organismos, bem como à superfícies celulares diversas, a MBL desempenha importante papel na manutenção da homeostasia do organismo (TURNER, 2003). Além de promover a opsonização e fagocitose de diversos micro-organismos, a MBL modula a inflamação, estimulando a liberação de citocinas de maneira dose-dependente e a eliminação de restos celulares (CHAKA et al., 1997).

As concentrações séricas da MBL são determinadas geneticamente, com variações significativas entre indivíduos (TURNER, 2003). Devido à importante função que desempenha na eliminação de micro-organismos e restos celulares, variações nas concentrações séricas da MBL são determinantes para a suscetibilidade à doenças infecciosas e autoimunes, podendo influenciar na gravidade e curso clínico (BROUWER et al., 2013).

Embora já se encontre bem caracterizada a participação da via clássica do SC na fisiopatologia da AR, o papel da MBL na predisposição ao desenvolvimento da doença e na gravidade da AR é um tema ainda contraditório (IP et al., 2000; SAEVARSDOTTIR et al., 2001; TROELSEN et al., 2007; BALLANTI et al., 2013).

Estudos têm demonstrado associação entre as concentrações séricas de MBL e polimorfismos do gene *MBL2*, e o prognóstico da AR (GARRED et al., 2000; JACOBSEN et al., 2001). Baixas concentrações da proteína parecem estar relacionadas ao desenvolvimento de complicações cardíacas em pacientes com AR e genótipos relacionados à deficiência de MBL mostraram associação com pior progressão radiográfica (GRAUDAL et al., 2000; TROELSEN et al., 2007). Também já foi descrita a relação entre MBL e a inflamação sinovial acentuada em pacientes anti-CCP positivos recém-diagnosticados, embora tal efeito não tenha se verificado em relação a outras complicações (JACOBSEN et al. 2009),

Por sua vez, são raros os estudos sobre o papel da MBL na AR envolvendo familiares de pacientes. SAEVARSDOTTIR et al. (2007) caracterizaram diferença acentuada nas concentrações da proteína entre pacientes com AR e seus familiares, sugerindo que altas concentrações de MBL podem predispor à doença.

As serina proteases associadas à MBL (MASP) são proteínas fundamentais para a ativação do SC pela via das lectinas (DEGN et al., 2012). Atualmente, são conhecidas três proteases, MASP-1, MASP-2 e MASP-3, sendo MASP-2 a mais frequentemente investigada. Sabe-se que MASP-2 exerce papel importante ao se ligar à MBL, permitindo a ativação de convertases do SC. Dessa forma, MASP-2 participa no reconhecimento de uma ampla variedade de micro-organismos, bem como na eliminação de restos celulares (THIEL et al., 1997).

São escassos os estudos relacionando alterações séricas de MASP-2 ou polimorfismos do gene *MASP2* e doenças. Porém, sabe-se que mutações no gene *MASP2* podem alterar as concentrações séricas da proteína, assim como gerar uma variante de MASP-2 não funcional, o que pode estar associado à DAIs e infecções recorrentes (SORENSEN, THIEL, JENSENIUS, 2005). Investigações envolvendo MASP-2 em pacientes com AR e familiares são inexistentes até o momento.

Aliado aos efeitos adversos resultantes do tratamento antirreumático, o trauma psicológico de vivenciar a invalidez econômica e social precoce torna o impacto socioeconômico da AR significativo. Diante da elevada prevalência da AR na população e do custo que essa representa aos sistemas de saúde, tornam-se fundamentais os estudos que propiciem maior compreensão sobre a fisiopatologia da doença. A geração de novos conhecimentos torna viável a inovação e melhoramento dos recursos disponíveis para o manejo clínico e terapêutico mais adequado e precoce para os pacientes com AR.

## **2 HIPÓTESE**

As concentrações séricas de MBL e MASP-2, bem como os polimorfismos dos genes *MBL2* e *MASP2*, estão associados com a susceptibilidade, perfil clínico e gravidade da artrite reumatóide.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar as concentrações séricas de MBL e MASP-2, e os polimorfismos gênicos de *MBL2* e *MASP2* em pacientes com artrite reumatóide e familiares, e verificar associações com aspectos clínicos da doença.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar polimorfismos presentes na região promotora (-221 C>G e -550 C>G), 5' não traduzida (+4 C>T) e no exon 1 (*p.R52C*, *p.G54D*, *p.G57E*) do gene *MBL2* em pacientes com AR, familiares e controles;
- Investigar polimorfismos presentes na região promotora (-175 C>A) e nos exons 3 (*p.R99Q*, *p.D120G*, *p.P126L*), 10 (*p.D371Y*, *p.V377A*) e 12 (*p.R439H*, *24762T>C*), e no intron 9 (+16060C>T) do gene *MASP2* em pacientes com AR, familiares e controles;
- Determinar as concentrações séricas de MBL e MASP-2 em pacientes com AR, familiares e controles;
- Investigar a associação entre as concentrações séricas de MBL e MASP-2 e os aspectos clínicos de pacientes com AR e familiares;
- Investigar a associação entre os polimorfismos de *MBL2* e *MASP2* e os aspectos clínicos de pacientes com AR e familiares;
- Investigar a associação entre as concentrações séricas de MBL e MASP-2, e polimorfismos de *MBL2* e *MASP2*, e a presença dos anticorpos anti-CCP e FR-IgM em pacientes com AR e familiares.

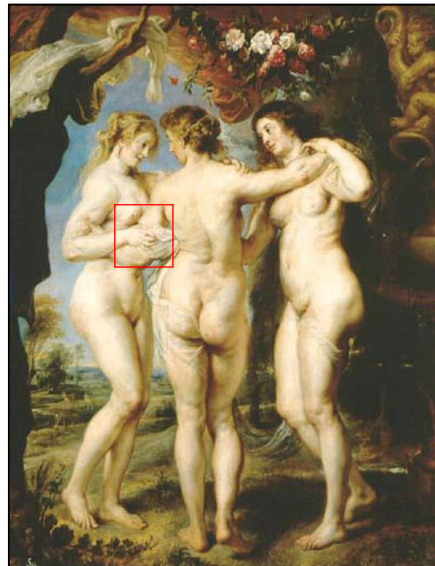
## 4 REVISÃO DA LITERATURA

### 4.1 ARTRITE REUMATÓIDE

A artrite reumatóide (AR) é uma doença incurável que afeta populações em diversas regiões do mundo, agravando problemas sociais e econômicos, especialmente nos países considerados em desenvolvimento.

Evidências arqueológicas comprovam a existência da AR entre nós desde a pré-história (ROTHSCHILD, TURNER, DeLUCA, 1988). Supõe-se que a AR tenha surgido nas Américas, sendo disseminada pelo resto do mundo com o advento da colonização europeia na região (ABDEL-NASSER et al., 1997).

Curiosamente, o artista belga Peter Paul Rubens (1577-1640) retratou com frequência em suas pinturas deformações possivelmente relacionadas à AR (FIGURA 1). Acredita-se que o próprio pintor tenha sofrido da doença, assim como o impressionista francês Pierre-Auguste Renoir e o arquiteto catalão Antoni Gaudí (MOTA, 2012).



Copyright © Museo Nacional del Prado, Madrid.

FIGURA 1 - “AS TRÊS GRAÇAS” DE PETER PAUL RUBENS

FONTE: RUBENS (1638) [http://jssgallery.org/Other\\_Artists/Rubens/ThreeGraces1.html](http://jssgallery.org/Other_Artists/Rubens/ThreeGraces1.html)

LEGENDA: Em destaque, possível deformação em *boutonniere*.

A AR é classicamente definida como uma doença inflamatória autoimune sistêmica e crônica. É considerada uma doença comum, cuja prevalência em adultos é estimada em 1%, sendo três vezes mais frequente em mulheres. Sua ocorrência varia de acordo com as características étnicas da população, sendo pouco frequente na África e Ásia, enquanto populações indígenas no Alasca apresentam prevalência de aproximadamente 5% (McGILL, OYOO, 2002; FERUCCI, TEMPLIN, LANIER, 2005; ZENG et al., 2008). Ao sul da Europa, a prevalência anual da AR é de 3,3 casos/ mil habitantes, já ao norte a prevalência sobe para 5 casos/ mil habitantes. Por sua vez, na América do Norte ocorrem 10,7 casos/ mil habitantes (ALAMANOS, VOULGARI, DROSOS, 2006). No Brasil, o estudo multicêntrico de MARQUES et al. (1993) verificou prevalência para a AR variando de 0,2% a 1%.

Com o aumento da expectativa de vida da população em geral, os efeitos deletérios da AR sobre a mobilidade física, capacidade funcional e qualidade de vida dos pacientes se tornou evidente. Aproximadamente 50% dos pacientes ficam impossibilitados de trabalhar em 10 anos a partir do início da doença, o que representa impacto econômico e social significativo (LUNDKVIST, KASTANG, KOBELT, 2008).

A AR é observada com maior frequência entre a quarta e quinta década de vida. Assim, pacientes com AR no ápice de sua produtividade são frequentemente obrigados a interromper inteira ou parcialmente suas atividades devido às limitações impostas pela doença. Dessa forma, diante do alto potencial incapacitante, estudos visando o entendimento da etiopatogênese da AR, bem como avanços no arsenal terapêutico, podem contribuir para a melhorar a perspectiva de vida dos pacientes com AR.

#### 4.1.1 Fatores de patogenicidade na artrite reumatóide

Evidências clínicas e experimentais corroboram a influência de fatores hormonais, ambientais e imunológicos no desenvolvimento das DAIs (FIGURA 2). Esses fatores atuam em conjunto sobre indivíduos geneticamente suscetíveis e seu efeito isolado é mínimo para o desenvolvimento dessas doenças (KLARESKOG et al., 2006).

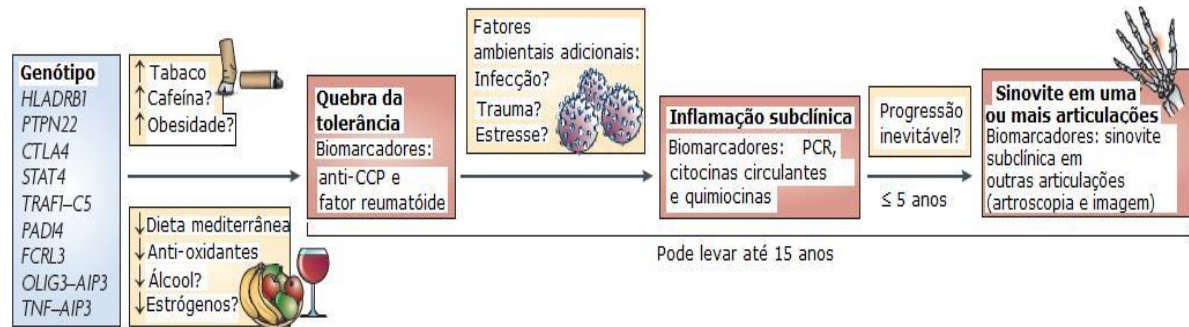


FIGURA 2 - LINHA DO TEMPO ATÉ A MANIFESTAÇÃO CLÍNICA DA AR  
 FONTE: ISAACS (2010)

Estudos amplos de associação genética têm confirmado a importância dos fatores genéticos na etiologia da AR em determinadas populações (MYOUIZEN et al., 2012; OKADA et al., 2012). A principal influência genética para o desenvolvimento da doença provém dos genes *HLA* (SHIOZAWA et al., 1998).

Os primeiros indícios dessa associação surgiram em 1969 através dos estudos de Astorga e Williams em linfócitos de pacientes com AR (ASTORGA E WILLIAMS 1969). A partir de então, a associação entre AR e os genes *HLA* tem sido confirmada por estudos em diversas populações, e é especialmente notável para os alelos *HLA-DRB1* (DELGADO-VEGA, ANAYA 2007; HOLOSHITZ et al., 2013; MITSUNAGA et al., 2013). Esses alelos determinam suscetibilidade à AR, bem como estão associados ao desenvolvimento de formas mais graves da doença. Porém, tal associação não predomina em todas as populações, o que ressalta a importância das diferenças populacionais em estudos genéticos (SHIOZAWA et al. 1998).

Os alelos *HLA-DRB1* compartilham sequências conservadas de aminoácidos nas posições 70-75 da terceira região de hipervariabilidade da cadeia  $\beta$ , compostas por glutamina-leucina-arginina-alanina-alanina (QRRAA, RRRAA, ou QKRAA), chamadas epítipo comum ou do inglês, *shared epitope* (SE) (SHIOZAWA et al., 1998). As sequências SE estão associadas apenas a pacientes com AR anti-CCP positivos, corroborando a ideia de que a positividade para esse anticorpo caracteriza duas formas distintas da doença (HUIZINGA et al. 2005).

Diversos polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) fora da região HLA já foram associados à susceptibilidade e ao fenótipo da AR, tais como proteína tirosina fosfatase não-receptor tipo 22 (OR=1,6; *PTPN22*), antígeno 4 de linfócito T citotóxico (OR=1,2; *CTLA-4*), sinal 3 ativador da transcrição (OR=1,3; *STAT4*) e

peptidilargininadeiminase tipo IV (OR=1.3; *PADI4*) (JIANG et al., 2012). Porém, essas associações variam de acordo com a população estudada (VIATTE, PLANT, RAYCHAUDHURI, 2013).

Estudos recentes apontam a associação entre a região cromossômica 1p36.3–36.2 e o desenvolvimento da AR e outras DAIs inflamatórias (SAWCER et al., 2011; JOSTINS et al., 2012). Tal região inclui diversos genes ligados à expressão de proteínas envolvidas na resposta imunológica, como as proteínas do SC.

Apesar do significativo volume de estudos visando a identificação de genes de suscetibilidade para a AR, acredita-se que apenas uma pequena parcela dos fatores genéticos relacionados ao desenvolvimento da doença tenham sido identificados (MANOLIO et al., 2009). Assim, possivelmente, variantes raras e/ou interações epistáticas estejam contribuindo para o desenvolvimento da AR em uma parcela significativa da população. A relevante influência genética e sua elevada diversidade reforçam a importância das investigações em pacientes de diferentes populações, em especial nas regiões onde há elevada taxa de miscigenação, como no Brasil (IBGE, 2009).

As DAI em geral apresentam maior prevalência no gênero feminino. A AR afeta 2 a 4 vezes mais mulheres do que homens, e formas mais graves da doença também parecem ser mais frequentes no gênero feminino (GOELDNER et al., 2011a). Alguns estudos têm demonstrado a influência dos hormônios sexuais sobre o desenvolvimento da doença (TEDESCHI et al., 2013).

Tanto o microbioma intestinal como bucal parecem participar da fisiopatologia da AR (CHO, BLASER, 2012; QUIRKE et al., 2013). Estudos recentes descrevem a associação entre a bactéria *Porphyromonas gingivalis* e a reação inflamatória nas articulações (QUIRKE et al., 2013). Essa associação se dá provavelmente através da indução da formação de autoantígenos citrulinados por parte da bactéria *P. gingivalis* levando à resposta autoimune característica da AR. Curiosamente, a relação entre doença periodontal e a AR, levaram, no passado, à técnicas de tratamento inusitadas, tais como a extração dentária (HUNTER, 1900). Outros micro-organismos também associados ao desenvolvimento da AR são *Proteus mirabilis* e o vírus Epstein-Barr (LOSSIUS et al., 2012; RASHID, EBRINGER, 2012).



Já se encontra bem estabelecida a relação entre o consumo de tabaco e a maior suscetibilidade ao desenvolvimento da AR em pacientes *HLA-SE* positivos (FARHAT et al., 2011). O consumo do tabaco também exerce influência sobre o fenótipo da AR, contribuindo para o desenvolvimento de formas mais graves da doença (GOELDNER et al., 2011a; RUIZ-ESQUIDE, SANMARTÍ, 2012). Aliado a esses aspectos, o baixo nível socioeconômico também é caracterizado como fator de risco e pior prognóstico para a AR (BERGSTRÖM et al., 2011).

#### 4.1.2 Fisiopatogenia da Artrite Reumatóide

A AR é resultante da interação complexa entre células T e B auto-reativas e citocinas que levam ao processo inflamatório crônico seguido de destruição e remodelação óssea (PABLOS, CAÑETE, 2013). Tais alterações ocorrem mais frequentemente em pequenas articulações de mãos e pés, porém articulações de grande porte também podem ser afetadas. Por ser uma doença extremamente heterogênea e complexa, tem-se sugerido a subclassificação da AR baseada na presença ou ausência de anticorpos anti-CCP, o que poderia indicar etiologias distintas para os subtipos de doença (HUIZINGA et al, 2005; ISAACS et al, 2010).

Estudos envolvendo biópsias da membrana sinovial têm ajudado a elucidar grande parte dos mecanismos patogênicos da AR, pois é nela que surgem os primeiros focos inflamatórios da doença. Esta membrana é normalmente formada por tecido conectivo composto pela camada íntima, abaixo da qual se encontram os vasos sanguíneos, linfáticos e nervos (FIGURA 3).

A camada íntima é a principal fonte de citocinas pró-inflamatórias e proteases na AR. Essas, em conjunto com osteoclastos e condrócitos, promovem a destruição articular. Concomitantemente, projeções de tecido proliferativo penetram na cavidade articular, invadindo a cartilagem e o tecido ósseo, formando o *pannus*, característico da AR (MOELANTS et al., 2013; FIGURA 3).

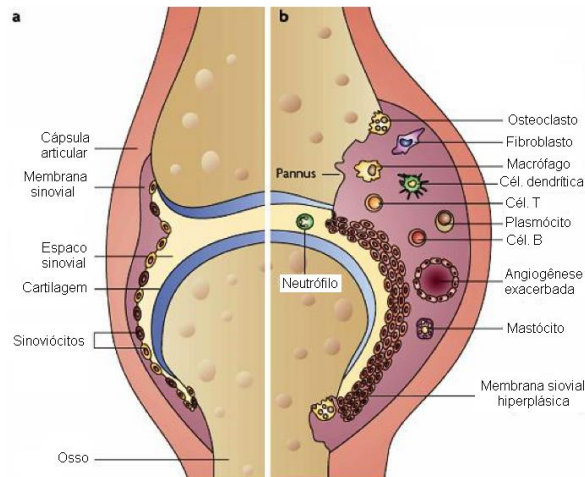


FIGURA 3 - ARTICULAÇÃO NORMAL E NA ARTRITE REUMATÓIDE

FONTE: Adaptado de SMOLEN, STEINER (2003)

LEGENDA: a = articulação normal; b = articulação na artrite reumatóide.

Diversos tipos celulares estão presentes na membrana sinovial reumatóide. Plasmócitos, células dendríticas, células *natural killer* (NK), linfócitos B e principalmente células T auxiliares se encontram dispersos ou organizados em agregados linfóides na sinóvia. Essas células atuam principalmente na produção de citocinas pró-inflamatórias, respostas antígeno-específicas, ativação de osteoclastos e reabsorção óssea (PABLOS, CAÑETE, 2013).

Acredita-se que na AR, moléculas próprias se tornam imunogênicas através de modificações pós-traducionais induzidas por agentes ambientais. Em indivíduos portadores do *HLA-SE*, a citrulinização aumenta a afinidade da ligação dos peptídeos modificados à molécula HLA que possui a sequência SE, aumentando dessa forma a imunogenicidade da proteína. Curiosamente, a resposta do sistema imunológico adaptativo aos peptídeos citrulinados pode preceder em anos o aparecimento dos sintomas clínicos da AR (KLARESKOG et al., 2006).

Após a apresentação do antígeno próprio citrulinado, plasmócitos iniciam a produção de autoanticorpos. Na membrana sinovial inflamada, os plasmócitos se localizam principalmente no centro germinativo do tecido linfóide secundário e são fonte de autoanticorpos e interleucina (IL) 6. Por sua vez, células apresentadoras de antígenos, assim como macrófagos ativados, são fontes de citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), IL-10, IL-6 e IL-17 (MOELANTS et al., 2013; FIGURA 4).

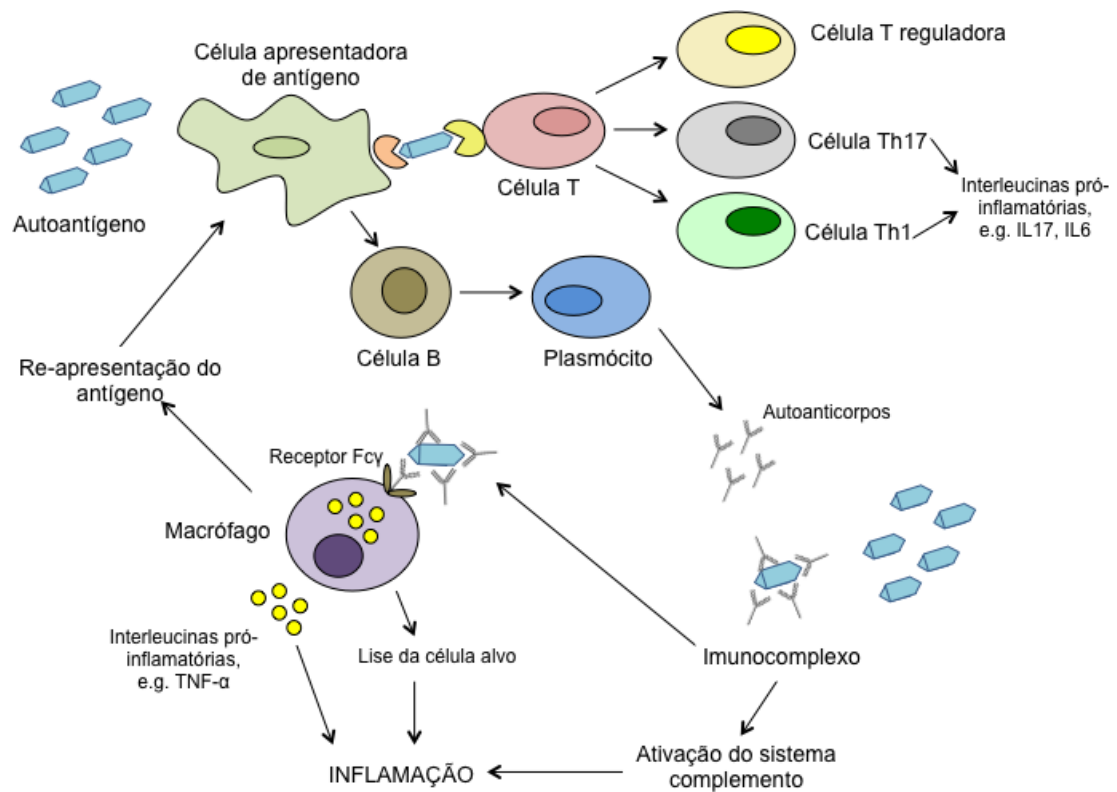


FIGURA 4 - MECANISMO DA INFLAMAÇÃO NA ARTRITE REUMATÓIDE

FONTE: O AUTOR

LEGENDA: Th = célula T auxiliar; Fcγ = receptor gama da região Fc; TNF-α = fator de necrose tumoral α; IL = Interleucina.

Na AR, o TNF-α é liberado principalmente pelos macrófagos sinoviais após estimulação via *Toll-like receptors*, imunocomplexos e outras citocinas (MOELANTS et al., 2013). Seus principais efeitos são liberação de outras citocinas, metaloproteases, diminuição da síntese de proteoglicanos, além de promover a diferenciação de monócitos em osteoclastos (FIGURA 5).

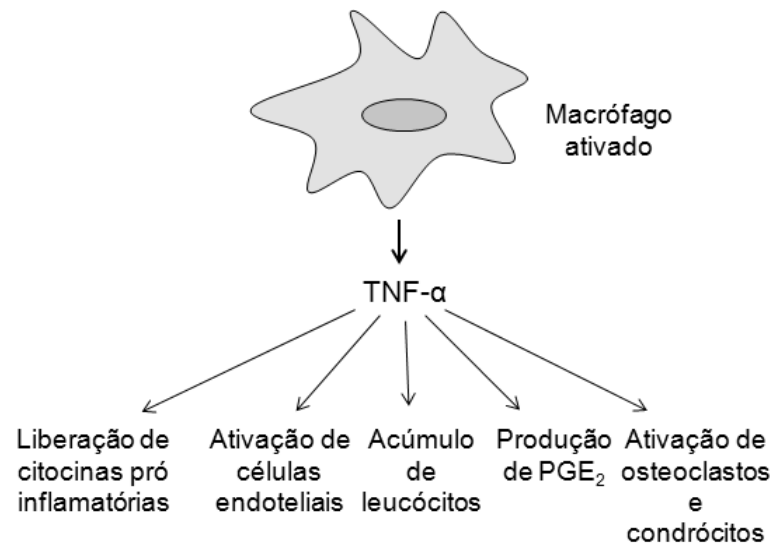


FIGURA 5 - FUNÇÕES DO TNF- $\alpha$  NA ARTRITE REUMATÓIDE

FONTE: O AUTOR

LEGENDA: TNF- $\alpha$  = fator de necrose tumoral  $\alpha$ ; PGE<sub>2</sub> = Prostaglandina E2.

Além do TNF- $\alpha$ , diversas outras citocinas atuam na fisiopatologia da AR. A IL-10 atua na regulação da produção de TNF- $\alpha$  pelos macrófagos (AGBANOMA et al., 2012). Já a IL-6 tem sua liberação aumentada pela interação entre sinoviócitos e células NK, e induz aumento das proteínas de fase aguda e ativação de osteoclastos, responsáveis pela reabsorção óssea (KISHIMOTO, 2010). Por sua vez, a IL-1 contribui para a inflamação na AR, proporcionando aumento na síntese de IL-6, quimiocinas e collagenases, e inibindo a ação de células T regulatórias (SMOLEN et al., 2012).

Atualmente, sabe-se que a citocina IL-17 desempenha papel fundamental na AR. Essa citocina é produzida por células Th17, um subtipo de célula CD4<sup>+</sup> efetora que atua ativamente no quadro inflamatório presente na AR e parece ter papel importante na fase inicial da doença (ARROYO-VILLA et al., 2012; LI et al., 2013a).

A IL-17 apresenta elevado potencial pró-inflamatório, atuando de maneira direta na destruição articular através da estimulação da produção de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  pelos macrófagos, IL-6, IL-8 e IL-23 pelos fibroblastos sinoviais, além de induzir metaloproteinases e estimular a invasão e consequente destruição da cartilagem.

Concomitantemente, IL-17 regula de maneira positiva a expressão do receptor ativador de NF- $\kappa$ B em osteoclastos, que têm papel central na erosão óssea e destruição articular (LI et al., 2013a).

As células B também possuem importante papel na imunopatogênese da AR (LI et al., 2013b). Além de estimular a proliferação e diferenciação de células Th1, as células B maduras são responsáveis pela produção de autoanticorpos característicos da AR (BOUMANS et al., 2011). Dois desses autoanticorpos, o FR-IgM e o anti-CCP têm papel fundamental na fisiopatologia da doença.

Apesar de vários aspectos da fisiopatologia da AR ainda serem incertos, evidências apontam para a importância do SC na mesma (MAKINDE et al., 1989; HIETALA et al., 2004). De maneira geral, o SC está envolvido tanto na etapa inicial do processo inflamatório na AR, como na sua progressão. A sua ativação inapropriada pode levar ao dano tecidual, através da ativação de macrófagos, fibroblastos e neutrófilos, e liberação de enzimas proteolíticas que levam ao dano tecidual. Paralelamente, a formação do complexo de ataque à membrana (MAC) provavelmente potencializa o processo inflamatório através da estimulação da produção e liberação de collagenases pelos fibroblastos (JAHN et al., 1993).

A ativação do SC na AR parece ocorrer principalmente no espaço articular, e componentes como complexos imunes, proteína C reativa e estruturas da cartilagem já foram descritos como ativadores desse sistema (MOLENAAR et al., 2001; SJÖBERG et al., 2005). Em especial, concentrações elevadas de complexos imunes, característicos da AR, têm papel central na ativação do SC nessa doença (SATO et al., 1993). Já concentrações séricas elevadas do componente C1q parecem contribuir para o risco de desenvolvimento da AR, através da ativação aumentada da via clássica (TROUW et al., 2011). Por sua vez, a via alternativa atua na amplificação da ativação pela via clássica (STURFELT, TRUEDSSON, 2012).

Além da ativação pela via clássica, a via das lectinas (VL) contribui com a ativação do SC na AR (MALHOTRA et al., 1995; AREND et al., 2013). Curiosamente, na AR ocorrem mudanças no padrão de glicosilação de IgG, o que parece favorecer a ligação de MBL e ativação do SC pela VL (MALHOTRA et al., 1995).

Entretanto, as proteínas do SC parecem ter papel duplo na fisiopatologia da AR: enquanto a ativação aumentada do SC parece estar associada ao surgimento ou ampliação do processo inflamatório na AR, deficiências desse sistema parecem favorecer o aparecimento da doença (CHEN, DAHA, KALLENBERG, 2010). Assim, mais estudos são necessários para esclarecer essa relação.

#### 4.1.3 Manifestações clínicas

Os sintomas clínicos da AR costumam ter início entre a quarta e quinta década de vida, e atingem com agressividade tendões, ligamentos, articulações e ossos, destruindo a arquitetura da articulação.

Classicamente, a AR se caracteriza por dor periarticular, edema e rigidez articular, que se manifestam de maneira simétrica. A sinovite acentuada e simétrica é característica da AR e pode afetar qualquer das articulações sinoviais diartrodiais (TEHLIRAN, BATHON, 2008). O impacto decorrente do envolvimento simétrico das articulações é acentuado e dificulta as tentativas cirúrgicas de correção ou substituição da articulação.

As articulações mais frequentemente afetadas na AR são as articulações sinoviais periféricas, tais como articulações metatarsofalangeanas, tornozelos e punhos. Entretanto, também pode haver comprometimento de joelhos, ombros, cotovelos e quadris. Articulações como a têmporomandibular, da coluna e laringe são ocasionalmente afetadas, o que pode dificultar o diagnóstico da AR (MAJITHIA, GERACI, 2007). Edema, dor e calor local são características das articulações afetadas, as quais podem ainda apresentar rubor local. Deformações articulares ocasionadas por inflamação persistente, tais como *boutonniere* ou em “pescoço de cisne”, são características da AR não tratada (TEHLIRAN, BATHON, 2008).

Além dos sintomas articulares, pacientes com AR apresentam com frequência manifestações extra-articulares, tais como síndrome de Sjögren, vasculites e nódulos reumatóides. Essas são indicativas de pior prognóstico e dificultam o tratamento (TURESSON, 2013).

As doenças de caráter isquêmico são importantes em pacientes com AR, pois representam a causa de aproximadamente 40% das mortes entre esses indivíduos (SOLOMON et al., 2013). Outras complicações, tais como maior frequência de infecções e infertilidade, também já foram descritas para a AR e devem ser investigadas oportunamente pelo clínico (CLOWSE et al., 2012; LISING, GERHOLD, ZINK, 2013).

Atualmente, com as estratégias terapêuticas mais avançadas, o prognóstico da AR melhorou significativamente. Porém, tal benefício se limita aos pacientes que desfrutam de acesso ao tratamento adequado.

#### 4.1.4 Diagnóstico e acompanhamento

O diagnóstico da AR pode ser complexo, especialmente nos estágios iniciais da doença. Nas últimas décadas, o diagnóstico precoce da AR foi reconhecido como fator decisivo para a garantia do melhor prognóstico do paciente. Foi nesse contexto que, em 2010, o Colégio Americano de Reumatologia (ACR), juntamente com a Liga Europeia contra o Reumatismo (EULAR), revisaram os critérios diagnósticos para a AR, os quais atualmente favorecem o diagnóstico precoce em pacientes com sintomatologia de curta duração.

Como pré-requisito para a aplicação dos atuais critérios de classificação, o paciente com suspeita de AR deve: (a) apresentar ao menos uma evidência clínica de sinovite ativa; (b) ter outra possibilidade diagnóstica, como lúpus eritematoso sistêmico, artrite psoriática ou gota, excluída (ALETAHA et al., 2010).

Os novos critérios são baseados em um sistema de graduação de sintomas de acordo com a TABELA 1.

Quando a soma dos itens de A até D resulta igual ou superior a 6, os achados correspondem à AR definida. Embora pacientes com somatório inferior a 6 não sejam considerados como tendo AR, os mesmos podem ser retestados e os critérios podem ser completados de maneira cumulativa no decorrer do tempo (ALETAHA et al., 2010).

TABELA 1 – CRITÉRIOS CLASSIFICATÓRIOS PARA ARTRITE REUMATÓIDE –  
ACR/ LIGA EUROPÉIA CONTRA REUMATISMO, 2010

	Pontos
<b>A- Envolvimento articular</b> – por envolvimento entende-se edema ou sensibilidade à palpação que podem ser confirmados por exames de imagem. <u>Excluem-se:</u> interfalangeanas distais, 1ª carpo-metacarpiana e 1ª tarso-metatarsiana.	
1 articulação grande (cotovelos, ombros, joelhos, coxo-femorais e tornozelos);	0
2-10 articulações grandes (cotovelos, ombros, joelhos, coxo-femorais e tornozelos);	1
1-3 articulações pequenas (com ou sem envolvimento de articulações grandes). São articulações pequenas: metacarpofalangeanas, interfalangianas proximais, 2ª a 5ª metatatarsofalangeanas, interfalangeanas do hálux e punhos;	2
4-10 articulações pequenas (com ou sem envolvimento de articulações grandes). São articulações pequenas: metacarpofalangeanas, interfalangeanas proximais, 2ª a 5ª metatatarsofalangeanas e, interfalangeanas do hálux e punhos;	3
> 10 articulações (com pelo menos 1 articulação pequena incluída).	5
<b>B- Sorologia</b> (o resultado de pelo menos um teste é necessário para a classificação)	
FR <b>E</b> anti-CCP negativo;	0
FR <b>OU</b> anti-CCP positivo fraco;	2
FR <b>OU</b> anti-CCP fortemente positivo.	3
<b>C- Reagentes de fase aguda</b> (o resultado de pelo menos um teste é necessário para a classificação)	
Proteína C reativa <b>E</b> VHS normal;	0
Proteína C reativa <b>OU</b> VHS alterado.	1
<b>D- Duração dos sintomas</b> (autorreferidos pelo paciente)	
< 6 semanas;	0
≥ 6 semanas.	1

FONTE: ALETAHA et al. (2010)

Por sua vez, a avaliação do grau de comprometimento do paciente em relação as suas atividades cotidianas é feita utilizando classes funcionais (STEINBROCKER, TRAEGER, BATTERMAN, 1949). Assim, os pacientes são classificados da seguinte forma:



- Classe I: o paciente é completamente capaz de executar atividades profissionais, de cuidado pessoal e de lazer;
- Classe II: o paciente é capaz de executar atividades profissionais e de cuidado pessoal, porém tem limitações na execução de atividades de lazer;
- Classe III: o paciente é capaz de executar atividades de cuidado pessoal, porém possui limitações em relação às atividades profissionais e de lazer;
- Classe IV: o paciente apresenta limitações para a execução de atividades profissionais, de cuidado pessoal e de lazer.

Métodos de diagnóstico por imagem, como a ressonância magnética, ultrassonografia e o raio X, são úteis não apenas no acompanhamento do paciente, como também no auxílio ao diagnóstico. Atualmente, a ressonância magnética é a técnica que traz mais benefícios ao diagnóstico da AR, pois é mais sensível às alterações de cartilagem e erosão óssea. Por sua vez, as técnicas radiológicas são bem menos sensíveis que a ressonância nuclear magnética, porém financeiramente mais acessíveis aos pacientes. Estudos recentes sugerem o uso de micro-ondas no auxílio ao diagnóstico precoce da AR (ZAMPELI et al., 2013).

Existem diversos índices para a avaliação da atividade da AR, sendo o índice de atividade de doença – 28 articulações (DAS 28) o mais amplamente utilizado. O cálculo do DAS 28 consiste na avaliação de 28 articulações (ombros, cotovelos, punhos, metacarpofalangeanas, interfalangeanas proximais e joelhos, bilateralmente) e se baseia no número de articulações dolorosas dentre essas 28. Ao fim, a atividade da doença é categorizada em remissão, baixa, moderada e alta (PINHEIRO, 2007). Esse índice é útil não apenas no acompanhamento do paciente, como também na avaliação da eficácia da estratégia terapêutica adotada.

#### 4.1.5 Autoanticorpos na Artrite Reumatóide

Diversos autoanticorpos já foram descritos na AR e suas positivities estão frequentemente associadas ao pior prognóstico para a doença, com o desenvolvimento de formas erosivas e manifestações extra-articulares (GOELDNER et al., 2011a; GOELDNER et al., 2011b; NELL-DUXNEUNER et al., 2009).

O primeiro anticorpo descrito na AR foi o fator reumatóide da classe IgM (FR-IgM), direcionado contra o fragmento cristalizável de imunoglobulinas do tipo G (IgG) (WAALER, 1939). Em 1998, Schellekens e colaboradores identificaram o aminoácido citrulina como o constituinte antigênico essencial dos autoanticorpos específicos para a AR, sendo estes denominados anticorpos antipeptídeo cíclico citrulinado (anti-CCP). Desde então foram realizados numerosos estudos envolvendo esses autoanticorpos até que, em 2010, o anti-CCP foi incorporado aos critérios de classificação da AR do ACR (ALETAHA et al., 2010).

A positividade para o FR-IgM e anti-CCP nos pacientes com AR pode ocorrer anos antes das manifestações clínicas iniciais, e já foram identificados em familiares saudáveis de pacientes, sendo ferramentas úteis no auxílio ao diagnóstico precoce da doença (GOELDNER et al., 2010; VAN DE STADT et al., 2011).

O FR atua ativamente na patogênese da AR e sua presença é sugestiva de prognóstico desfavorável (NELL-DUXNEUNER et al., 2009). A presença de imunocomplexos IgG-FR ativa o SC e resulta na resposta inflamatória acentuada, com liberação de histamina, produção de fatores quimiotáticos e lesão celular.

A ativação do SC pode ainda iniciar inflamação vascular com depósitos de FR em arteríolas, originando vasculites cujo impacto na qualidade e expectativa de vida do paciente é significativo (TURESSON, 2013). Além disso, o reconhecimento dos imunocomplexos por fagócitos promove liberação de diversas citocinas pró-inflamatórias, e a lise de células-alvo, o que exacerba ainda mais o processo inflamatório (MOELANTS et al., 2013).

Em relação ao isotipo, o FR pode ser das classes IgA, IgG e IgM, sendo esse último o mais frequentemente determinado, possuindo sensibilidade de aproximadamente 74% e especificidade de 77% para a AR. Entretanto, o FR-IgM pode estar presente em outras doenças e na população sadia, o que restringe seu uso isolado (CHATFIELD et al., 2009).

Por sua vez, o anti-CCP possui elevado valor preditivo: pacientes com artrite inicial que ainda não preencheram os critérios do ACR, porém que possuem anti-CCP positivo, possuem mais chances de virem a desenvolver AR, especialmente se os títulos forem elevados (WILLEMZE et al., 2012). O anti-CCP tem demonstrado sensibilidade e especificidade altas (81% e 95% respectivamente) e sua positividade está relacionada ao pior prognóstico (CHATFIELD et al., 2009).

#### 4.1.6 Tratamento da Artrite Reumatóide

A AR é uma doença incurável e, como na maioria das doenças crônicas autoimunes, a heterogeneidade dos pacientes contribui para que a resposta à terapia não seja uniforme. Nesse contexto, o tratamento da AR objetiva a redução da morbimortalidade relacionada à doença através do controle de seu processo inflamatório e redução da dor e edema articular (ISAACS, 2010).

Com o reconhecimento da “janela de oportunidade” na AR, tornou-se essencial a implantação precoce e agressiva do tratamento. Durante esse período, que varia de 6 meses até dois anos, a intervenção terapêutica efetiva modifica de forma significativa o curso natural da AR (VAN NIES et al., 2013).

O tratamento da AR consiste na associação de diferentes classes de medicamentos, além da abordagem não farmacológica através de medidas como a educação do paciente, fisioterapia e terapias psicológica e ocupacional.

Atualmente, os seguintes medicamentos são utilizados no tratamento da AR: drogas anti-inflamatórias não-esteroidais, corticoesteróides e drogas antirreumáticas modificadoras de doença (DMARD), incluindo agentes imunobiológicos.

Os anti-inflamatórios não-esteroidais e corticoesteróides são utilizados no controle do processo inflamatório, evitando a dor e o edema articulares (DENNISON, COOPER, 1998).

Por sua vez, o uso das DMARDs reduz o avanço da doença e melhora seu prognóstico a longo prazo, sendo o metotrexato a principal DMARDs utilizada na AR. Também são utilizados hidroxicloroquina, sulfassalazina, leflunomida, ciclosporina e azatioprina (ISAACS, 2010; MOTA et al., 2012).

Os agentes biológicos são a geração mais recente de drogas antirreumáticas e incluem receptores e anticorpos monoclonais direcionados para processos específicos da patogênese da AR. Essas drogas apresentam elevada efetividade no controle dos sintomas da AR, mesmo em pacientes com doença avançada, com notáveis benefícios em relação ao dano articular.

Apesar dos benefícios, aproximadamente 20% dos pacientes com AR não respondem ao tratamento com agentes biológicos. Além disso, essa classe de

medicamentos costuma ser mais cara que as DMARDs convencionais, bem como estão relacionadas a efeitos colaterais mais graves (ISAACS, 2010).

São representantes dessa classe de medicamentos os antagonistas de TNF- $\alpha$  (infliximabe, etanercepte, adalimumabe, golimumabe, certolizumabe), anticorpos anticélulas B (rituximabe), reguladores da co-estimulação de células T (abatacepte), inibidores do receptor de IL6 (tocilizumabe) e IL1 (anakinra). No Brasil, os medicamentos biológicos aprovados para uso são: infliximabe, etanercepte, adalimumabe, certolizumabe, golimumabe, rituximabe, abatacepte, tocilizumabe. Atualmente todos esses medicamentos estão disponíveis no Sistema Único de Saúde (BRATS, 2012).

Diversas linhas inovadoras de investigação visam o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para a AR (LI et al., 2013b). Dentre elas, destacam-se estudos envolvendo o SC, bem como estratégias farmacogenômicas (GOODFELLOW et al., 2000; KATSCHKE et al., 2007). Recentemente, a neutralização do componente C5 nas articulações inflamadas de modelos animais de AR, assim como o desenvolvimento de vacinas anti-C5a, se mostraram eficazes na redução do edema e do processo inflamatório, podendo ser estratégias promissoras para o tratamento e prevenção da AR (NANDAKUMAR et al., 2010; DURIGUTTO et al., 2013).

Assim, o tratamento da AR é um processo contínuo que associa a terapia farmacológica combinada com medidas não farmacológicas, e exige dedicação e atenção tanto do médico quanto do paciente. Apesar dos significativos avanços, ainda persistem diversas dúvidas e controvérsias sobre a terapia de escolha na AR, e estudos ainda são necessários para que a remissão seja uma realidade para a maioria dos pacientes.

#### 4.2 FAMILIARES DE PACIENTES COM ARTRITE REUMATÓIDE

A agregação familiar da AR é comum e tanto mais evidente quanto maior a gravidade da doença. Michou et al. (2008) sugerem que a AR está entre as DAI mais comuns em familiares de pacientes com AR.

Investigações envolvendo gêmeos mono e dizigóticos demonstraram a contribuição genética para o desenvolvimento da AR, a qual é estimada em 60%

(MacGREGOR et al. 2000). De acordo com Bali et al. (1999), a prevalência para a doença aumenta para 2-4% entre irmãos, em comparação à 1% na população em geral. Entretanto, essa influência genética pode variar de acordo com a população estudada em decorrência de variações nos fatores genéticos aditivos e não aditivos, variações epigenéticas, bem como nos fatores ambientais envolvidos (VIATTE, PLANT, RAYCHAUDHURI, 2013).

Evidências sorológicas contribuem para a caracterização de familiares de pacientes com AR como um grupo de risco para o desenvolvimento da doença (GOELDNER et al., 2011). Estudos recentes associam a positividade para o anti-CCP em familiares saudáveis de pacientes com AR ao desenvolvimento da doença (YOUNG et al, 2013). Entretanto, ambas a positividade e a especificidade do teste parece diferir de acordo com o grau de risco para a AR na população analisada (DEMORUELLE et al., 2013). Além dos aspectos genético e sorológico, acredita-se que a agregação familiar da AR possa também estar relacionada ao gênero e à idade de início da doença no familiar afetado, o que evidencia a complexidade da doença (KWOH et al., 1996; GRANT et al., 2001).

Além do aumento na suscetibilidade para a doença, familiares de pacientes com AR parecem também ser mais suscetíveis ao desenvolvimento da AR em sua forma mais grave. Rojas-Villarraga et al. (2009) demonstraram que a história familiar é o principal fator relacionado ao tempo necessário para o surgimento de erosão articular significativa.

Nesse contexto, estudos visando a identificação de fatores de suscetibilidade para a AR são de grande importância para o desenvolvimento de estratégias que possibilitem o diagnóstico precoce da doença.

## 4.3 O SISTEMA COMPLEMENTO

### 4.3.1 Aspectos gerais

O sistema complemento (SC) faz parte da resposta imunológica inata e representa um grupo de proteínas fundamentais para a defesa do hospedeiro. A imunidade inata é a primeira linha de defesa contra patógenos e é considerada um mecanismo de defesa evolutivamente antigo (SUNYER, ZARKADIS, LAMBRIS,

1998). A ativação da imunidade inata se dá de maneira rápida e limita de forma eficiente a infecção, possibilitando o desenvolvimento da resposta imunológica adaptativa (ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2012).

Identificado pelo médico belga Jules Bordet em 1896, o SC foi primeiramente considerado um mecanismo de ação secundário. Atualmente ele é considerado imprescindível na manutenção da homeostase e, ao contrário do que seu nome sugere, esse sistema tem papel fundamental em diversos processos fisiológicos (RICKLIN et al., 2010).

O SC é formado por um conjunto de mais de 35 proteínas plasmáticas ou associadas às membranas celulares. Diversas células são capazes de sintetizar essas proteínas, porém a maior contribuição vem dos hepatócitos, macrófagos, células endoteliais e mesangiais renais (ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2012).

A participação do SC na opsonização e fagocitose de micro-organismos, ativação de células inflamatórias e na citólise mediada pela formação do complexo de ataque à membrana (MAC) é fundamental e já bem estabelecida (ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2012). O SC também é capaz de diferenciar tecidos saudáveis, de restos celulares, células apoptóticas ou micro-organismos, direcionando a resposta imunológica (WALPORT, 2001).

O SC participa de diferentes processos fisiológicos, tais como eliminação de complexos imunes, maturação de sinapses, mobilização de células tronco progenitoras hematopoiéticas, angiogênese, regeneração tecidual e metabolismo lipídico (RICKLIN et al., 2010). Também é mediador de interações celulares e humorais incluindo quimiotaxia, fagocitose, adesão celular e diferenciação de células B (CARROLL, SIM, 2011).

Diversos componentes do SC possuem função regulatória e de reconhecimento de antígenos. Tais proteínas se encontram em delicada homeostasia que, quando comprometida, provoca reações inadequadas, culminando muitas vezes com o reconhecimento e ataque de estruturas próprias e desenvolvimento de processos patológicos (CHEN et al., 2010).

#### 4.3.2 Vias de ativação

Três diferentes vias iniciam a cascata do complemento: clássica, alternativa e das lectinas (VL). A ativação através da via clássica requer a ligação do componente C1q a imunocomplexos solúveis ou fixos na superfície celular ou na matriz extracelular, ou então à proteína C reativa. Já a via alternativa é ativada espontânea e continuamente, o que mantém o SC sempre alerta. Adicionalmente, imunocomplexos formados por IgA, assim como colágeno tipo II, são capazes de ativar a via alternativa (ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2012).

Por sua vez, a ativação pela VL se dá pela ligação da MBL associada à serina proteases associadas à MBL (MASP) a padrões de carboidratos presentes na superfície de micro-organismos ou estruturas próprias modificadas (CARROLL, SIM, 2011). Além de MBL e MASPs, também fazem parte da VL as ficolinas, bem como a recém-descrita colectina 11 (HANSEN et al., 2010, FIGURA 6).

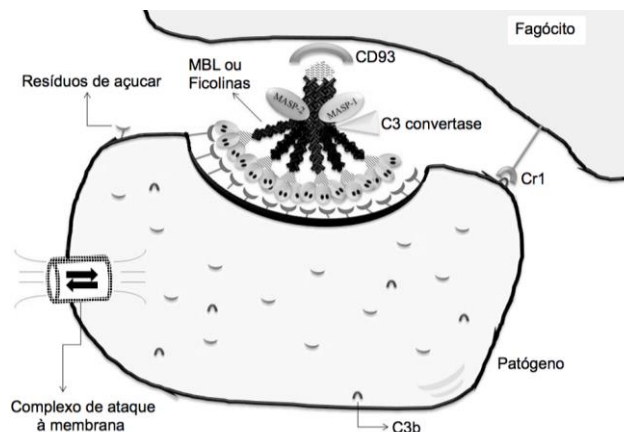


FIGURA 6 - ATIVAÇÃO DO SISTEMA COMPLEMENTO PELA VIA DAS LECTINAS  
 FONTE: Adaptado de BOLDT, GOELDNER, MESSIAS-REASON (2012).

O resultado comum para às três vias de ativação do SC é a formação de proteases em decorrência da união sequencial de proteínas, sendo C3 a principal. A clivagem de C3 provoca uma cascata de clivagens sequenciais dos demais componentes, resultando na liberação das moléculas pró-inflamatórias C3a, C4a e C5a, na opsonização e eliminação de patógenos através das opsoninas C4b e C3b, e na formação do MAC pelos componentes C5b-9, culminando na destruição da célula-alvo (ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2012).

## 4.4 PROTEÍNA LIGANTE DE MANOSE (MBL)

### 4.4.1 Aspectos gerais

A MBL é a proteína central da ativação da VL e seu papel na defesa do hospedeiro foi inicialmente proposto por Ikeda e colaboradores em 1987.

Caracterizada como uma proteína solúvel dependente de cálcio, a MBL desempenha importante papel na primeira linha de defesa do hospedeiro contra infecções causadas por bactérias, fungos e vírus (ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2012). Esta proteína se liga a uma grande variedade de açúcares, tais como N-acetil-D-glucosamina, manose, N-acetil-manosamina, fucose e glucose, expressos por diferentes micro-organismos e estruturas celulares, mediando a fagocitose e a ativação do SC. Muitos dos açúcares aos quais a MBL se liga não estão normalmente expostos em grandes concentrações nas superfícies celulares de mamíferos, o que dificulta o reconhecimento de estruturas próprias e favorece a interação mais apropriada com superfícies microbianas (ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2012).

### 4.4.2 Estrutura e funções

A MBL pertence à subfamília de proteínas conhecidas como colectinas, assim chamadas por serem moléculas compostas de uma região colagenosa e um domínio de lectina do tipo C, responsável pelo reconhecimento de carboidratos (DRC) (KAWASAKI et al., 1983).

A MBL humana é composta por oligômeros de até 6 subunidades, sendo que cada monômero é formado por 3 cadeias polipeptídicas idênticas de 25kDa, passando à 32kDa após glicosilação. As cadeias polipeptídicas são compostas por: um DRC, através do qual a MBL se liga aos patógenos ou superfícies celulares; uma região hidrofóbica chamada de pescoço; uma região colagenosa e uma região N-terminal rica em cisteína (FIGURA 7). As três cadeias interagem através das regiões colagenosas, formando uma tripla hélice. A região hidrofóbica de cada cadeia adota forma espiralada e os DRC apresentam características de proteínas globulares (GARRED et al., 2009).



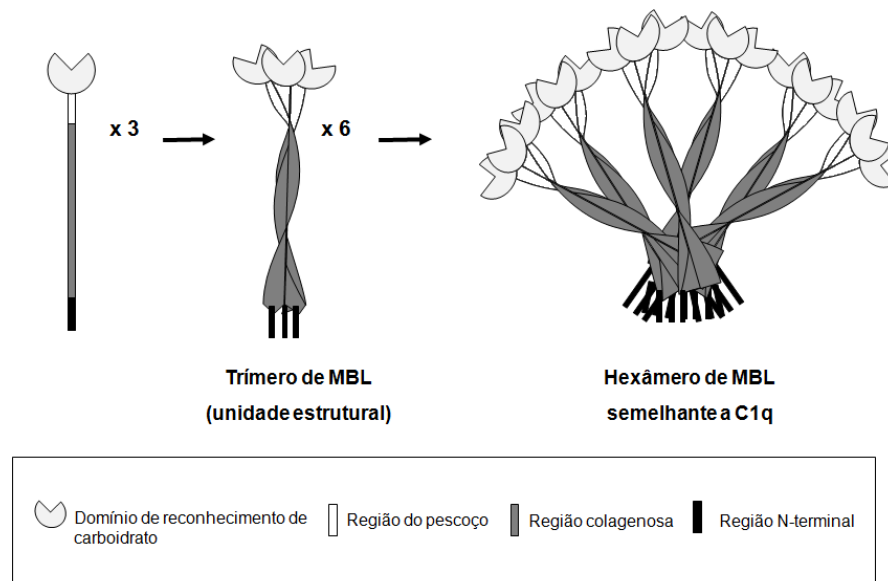


FIGURA 7 - ESTRUTURA E ORGANIZAÇÃO MOLECULAR DA MBL

FONTE: BOLDT, GOELDNER, MESSIAS-REASON (2012)

O trímero é estabilizado por interações hidrofóbicas e pontes dissulfeto entre as regiões N-terminais e se associa em oligômeros de duas a seis subunidades, formando uma estrutura quaternária com a aparência de um “buquê de tulipas”. A sua estrutura tridimensional é similar à do componente C1q (ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2012).

Para a completa atividade funcional, a MBL necessita de uma estrutura mínima em tetrâmero e que os três DRC obedecem a distâncias constantes de separação entre si. A distância entre os três domínios lectina é cerca de  $45^\circ$ , o que torna inviável a ligação a uma molécula simples de manose, porém favorece a interação com padrões repetitivos de açúcares característico de micro-organismos (SHERIFF, CHANG, EZERKOWITZ, 1994; WEIS, DRICKAMER, 1994).

Aminoácidos altamente conservados nas alças peptídicas externas dos DRC formam pontes coordenadas com cálcio e os grupos hidroxilas 3 e 4 nos resíduos de açúcares da molécula alvo. Embora a afinidade de cada interação lectina-açúcar seja de apenas  $10^{-3}\text{M}$ , a oligomerização da MBL permite ávida ligação aos carboidratos, devido aos múltiplos sítios que se ligam simultaneamente (IOBST et al., 1994).

A MBL é um dos componentes mais versáteis do sistema imunológico inato, apresentando características funcionais análogas à IgM, IgG e C1q, incluindo o reconhecimento e eliminação de micro-organismos e células apoptóticas, e a modulação da produção de citocinas como TNF- $\alpha$  e IL-12 (HARTSHORN et al., 1993; GREEN et al., 1994; CHAKA et al., 1997; WANG et al., 2011; ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2012). Estudos recentes têm sugerido a atuação da MBL na cicatrização óssea e no processo de coagulação (TAKAHASHI et al, 2011; VAN DER ENDE et al, 2013). Diferentes oligômeros também parecem exercer atividades biológicas diferentes (HOLMSKOV, THIEL e JENSENIUS, 2003).

A diversidade e importância de suas funções explicam por que a deficiência de MBL foi primeiro identificada em associação à disfunção opsonica grave em crianças com infecções de repetição (SUPER et al., 1989). De fato, uma relação altamente significativa foi encontrada entre baixas concentrações séricas de MBL e falhas na opsonização e, atualmente, é discutida a terapia de reposição de MBL para a prevenção de complicações em doenças como a fibrose cística (CHALMERS et al., 2011).

#### 4.4.3 Polimorfismos do gene *MBL2*

Polimorfismos na região promotora e exon 1 do gene *MBL2* determinam as concentrações séricas de MBL e explicam a significativa variação interindividual dessas concentrações (MADSEN et al., 1994). Esses polimorfismos podem tanto influenciar a concentração sérica de MBL, como causar defeitos em sua polimerização e perda de funcionalidade (GARRED et al., 2009).

O gene *MBL2* está localizado no cromossomo 10q11.2-q21 (SASTRY et al., 1989), e compreende uma região que inclui 10 kb, onde existem ao menos 87 sítios polimórficos, alguns dos quais influenciam as concentrações séricas da proteína. O gene é composto por 4 exons e 3 íntrons. O exon 1 codifica o peptídeo sinal, a região N-terminal e parte da região colagenosa, enquanto o exon 2 codifica o restante da região colagenosa. O exon 3 codifica a região hidrofóbica espiralada conhecida como pescoço e o exon 4 o DRC (FIGURA 8) (GARRED et al., 2009).

Polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) na região promotora do gene *MBL2*, *MBL2*\*H,L (localizado a 550 pb antes do sítio de transcrição), X, Y (localizado

a 221 pb antes do sítio de transcrição) e *P*, *Q* (SNP não codificador localizado a 4 pb após o sítio de transcrição) são conhecidos por afetar a concentração sérica de MBL (HOLMSKOV, THIEL, JENSENIUS, 2003).

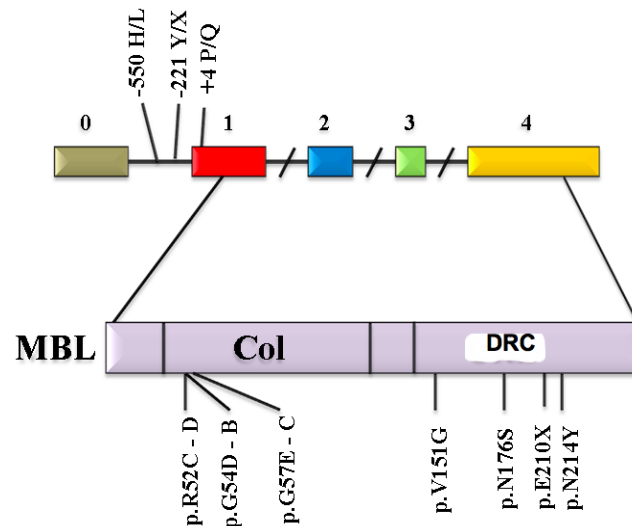


FIGURA 8 - POLIMORFISMOS DO GENE *MBL2* E LOCALIZAÇÃO NA PROTEÍNA

FONTE: BOLDT, GOELDNER, MESSIAS-REASON (2012)

LEGENDA: MBL = proteína ligante de manose; Col = região colagenosa; DRC = domínio de reconhecimento de carboidrato

Concomitantemente, três SNPs nos códons 52 (*Arg52Cys*, alelo *D*), 54 (*Gly54Asp*, alelo *B*) e 57 (*Gly57Glu*, alelo *C*) do exon 1 resultam em falha na produção da MBL completa e funcional e alteram suas concentrações séricas, levando à deficiência em indivíduos homozigotos (WALLIS, 2002).

O desequilíbrio de ligação existente entre os SNPs na região promotora e exon 1 é responsável pela ocorrência de apenas oito haplótipos comuns para *MBL2*, ao contrário dos 64 teoricamente possíveis. Cada qual exerce influência nas concentrações séricas da proteína da seguinte maneira: *MBL2*\**HYP A* > *LYQA* > *LYPA* > *LXPA* >> *HYPD* = *LYPB* = *LYQC* = *LYPD* (BOLDT et al., 2006).

Os diferentes polimorfismos de *MBL2* resultam em variações nas concentrações séricas de MBL que podem chegar a até mil vezes em indivíduos aparentemente saudáveis. Curiosamente, indivíduos saudáveis, mesmo com genótipos idênticos, podem apresentar variações significativas nas concentrações de MBL (DOMMETT, KLEIN, TURNER, 2006).

Além das variações genéticas, outros fatores podem alterar as concentrações séricas de MBL, incluindo hormônios do crescimento e da tireoide, bem como a resposta inflamatória (THIEL et al., 1992, HANSEN et al., 2001, RIIS et al., 2005). Entretanto, tal variação é limitada quando comparada aos valores determinados pela variação genética (HOLMSKOV, THIEL, JENSENIUS, 2003).

#### 4.4.3.1 Nomenclatura dos haplótipos de *MBL2*

Com o objetivo de facilitar análises e associações, os três SNPs no exon 1 do gene *MBL2* são frequentemente denominados *MBL2*\*D, \*B e \*C. Por sua vez, os alelos D, B e C são coletivamente denominados O, enquanto os alelos selvagens desses *loci* são chamados A. Já os três SNPs na região promotora do gene *MBL2* são chamados *MBL2*\*H, L; X, Y e P, Q. Portanto, 6 diplótipos formados pelas variante X/Y na região promotora e A/B/C/D no exon 1 podem ser formados: YA/YA e XA/YA associados com altas concentrações de MBL, YA/YO com concentrações intermediárias e XA/XA, XA/YO e YO/YO com baixas concentrações de MBL (MINCHINTON et al., 2002; BOLDT et al., 2006).

Visando uniformizar a designação dos diferentes haplótipos de *MBL2*, Boldt et al., (2010) propuseram um sistema filogenético de nomenclatura baseado na evolução dos haplótipos de *MBL2* conhecidos. No quadro 1 estão os 8 haplótipos comuns para *MBL2* e suas nomenclaturas atualmente utilizadas.

Nomenclatura abreviada	Nomenclatura filogenética**	Nomenclatura da Sociedade Científica das Variações do Genoma Humano*
<i>HYP A</i>	*1B1- <i>h</i>	[g.4447C>G; g.4776G; g.5000C; g.5219C; g.5226G; g.5235G]
<i>LYQ A</i>	*4A1- <i>h</i>	[g.4447C; g.4776G; g.5000C>T; g.5219C; g.5226G; g.5235G]
<i>LYP A</i>	*1A1- <i>h</i>	[g.4447C; g.4776G; g.5000C; g.5219C; g.5226G; g.5235G]
<i>LXP A</i>	*1C1- <i>l</i>	[g.4447C; g.4776G>C; g.5000C; g.5219C; g.5226G; g.5235G]
<i>HYP D</i>	*1B2- <i>l</i>	[g.4447C>G; g.4776G; g.5000C; g.5219C>T; g.5226G; g.5235G]
<i>LYP B</i>	*1F1- <i>l</i>	[g.4447C; g.4776G; g.5000C; g.5219C; g.5226G>A; g.5235G]
<i>LYQ C</i>	*4F1- <i>l</i>	[g.4447C; g.4776G; g.5000C>T; g.5219C; g.5226G; g.5235G>A]
<i>LYP D</i>	*1A1.1B2- <i>l</i>	[g.4447C; g.4776G; g.5000C; g.5219C>T; g.5226G; g.5235G]

QUADRO 1 – NOMENCLATURA DOS HAPLÓTIPOS DE *MBL2*

NOTA: \*Sequência referência: NG\_008196.1, \*\*De acordo com Boldt et al. (2010).

#### 4.4.4 Polimorfismos de *MBL2* e implicações clínicas

Desde que Super et al. em 1989 observaram que a deficiência de MBL era a base para o defeito na opsonização de micro-organismos, variações nas concentrações de MBL têm sido associadas à diversas características clínicas, tais como aumento de infecções, problemas renais e alguns tipos de câncer (BROUWE et al., 2013; LU et al., 2013; SWIERZKO, KILPATRICK, CEDZYNSKI, 2013).

Por outro lado, mecanismos que diminuem a ativação do complemento, podem dificultar a entrada e disseminação de patógenos intracelulares, tendo em vista que altas concentrações de MBL favorecem infecções por organismos intracelulares, como *Mycobacterium leprae* (DORNELLES, PEREIRA-FERRARI, MESSIAS-REASON, 2006) e *Leishmania chagasi* (SANTOS et al., 2001), que utilizam a opsonização por C3 e seu receptor para entrar na célula do hospedeiro.

Ainda, a ausência de MBL parece favorecer a recuperação tecidual em casos de isquemia e injúria pós-reperusão do miocárdio (JORDAN, MONTALTO, STAHL, 2001). O envolvimento da MBL com o dano tecidual causado pela excessiva ativação do SC permite especular o uso de inibidores da VL visando reduzir a injúria tecidual (MAURIELLO et al., 2013).

Por sua vez, concentrações séricas elevadas de MBL podem conferir, em certas circunstâncias, desvantagens biológicas (EZERKOWITZ, 1998; TURNER, HAMVAS, 2000) por exacerbar a inflamação sistêmica e local através da ativação do complemento e produção de citocinas inflamatórias (JACK et al., 2001; FIANE et al., 2003). Diferentes autores demonstraram que altos valores de MBL podem estar envolvidos na patogênese da complicação micro e macrovascular no diabetes *mellitus* tipo 1 (HOVIND et al., 2005), na patogênese das manifestações renais da púrpura de Henoch-Schonlein (ENDO et al., 2000) e em algumas formas de glomerulonefrites humanas (LHOTTA et al., 1999). Schafranski et al. (2008a) identificaram relação entre genótipos associados a altas concentrações séricas de MBL e risco aumentado de cardite aguda e crônica em pacientes com histórico de febre reumática.

Estudos ressaltam a importância dos polimorfismos do gene *MBL2* na imunodeficiência comum variada e nas infecções pelo herpes simplex vírus 2,

(AGHAMOHAMMADI et al., 2009; SEPPÄNEN et al., 2009). Outros autores sugerem ainda que a MBL também é capaz de modular a gravidade e a transmissão de doenças infecciosas como a síndrome da imunodeficiência humana (GARRED et al., 1997; ISRAELS et al., 2012).

Variações genéticas relacionadas à baixas concentrações séricas de MBL foram recentemente relacionadas à infecções pós cirurgia articular em populações do leste europeu (NAVRATILOVA et al., 2012).

A relação da MBL com DAIs tais como o LES, dermatomiosites e síndrome de Sjögren já foi sugerida por diversos estudos (WERTH et al., 2002; SEIBOLD et al., 2004; RAMOS-CASALS et al., 2009; PANDA et al., 2012). Alguns autores relatam valores baixos de MBL ou frequência aumentada de alelos mutantes em pacientes com DAI, sugerindo uma possível associação entre a deficiência de MBL e a patogênese das DAIs (SULIVAN et al., 1996; DAVIES et al., 1997). O importante papel da VL na ativação do SC e na eliminação de células apoptóticas ilustra o seu papel no desenvolvimento de DAIs (TURNER, HAMVAS, 2000).

A colocalização de MBL e células apoptóticas observada em biópsias intestinais de pacientes italianos com doença celíaca sugere envolvimento da proteína na patogênese da doença (BONIOTTO et al., 2005). Porém, Carvalho et al. (2007) não observaram associação entre as concentrações séricas de MBL e características clínicas da doença celíaca.

#### 4.4.5 A MBL na Artrite Reumatóide

Além do efeito benéfico para o hospedeiro, o complemento participa na etiologia de diferentes doenças, nas quais sua ativação imprópria promove inflamação e consequente destruição tecidual. O envolvimento do complemento na patogênese de doenças inflamatórias e autoimunes já foi comprovado por diversos estudos, porém os mecanismos exatos envolvidos nessa relação permanecem ainda uma incógnita (WALPORT, 2001; CHEN et al., 2010).

A MBL está envolvida na modulação da liberação do TNF- $\alpha$  pelos monócitos, uma citocina central na patogênese da AR (CHAKA, 1997). Assim, é possível que o aumento de MBL possa levar à falha no mecanismo de modulação da liberação de TNF- $\alpha$ , com consequências potencialmente graves para os pacientes com AR. Essa

hipótese é corroborada pelo estudo de Troelsen et al. (2007), que relata a associação entre SNPs determinantes de concentrações séricas elevadas de MBL e risco aumentado de doenças cardíacas isquêmicas, infarto do miocárdio e morte prematura nos pacientes com AR.

A presença de alelos variantes de *MBL2* está relacionada a defeitos de opsonização e mau prognóstico de DAI tais como a AR (GARRED et al., 2000; IP, 2000). A deficiência de MBL predispõe à forma erosiva da AR, sendo que a expectativa de vida desses pacientes é diminuída em 8 anos com relação aos indivíduos MBL-competentes (GRAUDAL et al., 2000; JACOBSEN et al., 2001). Baixas concentrações séricas de MBL em pacientes com AR também estão associados às complicações decorrentes de infecções (GARRED et al., 2000; GRAUDAL et al., 2000). Além disso, segundo Maury et al. (2007), a presença das variantes estruturais O do gene *MBL2* predispõe ao desenvolvimento de amiloidose reativa, uma complicação da AR (NAKAMURA, 2008). Já o polimorfismo do códon 54 do exon 1 de *MBL2* está associado à AR dependendo da população estudada (XIE et al., 2012).

Por sua vez, Jacobsen et al. (2009) demonstraram que a MBL está relacionada à inflamação sinovial acentuada em pacientes anti-CCP positivos recém-diagnosticados, porém não houve relação com a presença de erosão articular. Os autores ressaltam ainda a relação entre elevados escores de atividade da doença e invalidez, com genótipos que configuram elevada produção de MBL nesses pacientes. Corroborando o papel da MBL na inflamação sinovial, dados recentes indicam elevação das concentrações de MBL no fluído sinovial de pacientes com AR em relação a outras artropatias (AMMITZBOLL et al., 2012).

Saevarsdottir et al. (2007) caracterizaram diferença acentuada nas concentrações de MBL entre pacientes com AR e seus familiares, sugerindo que altas concentrações da proteína podem predispor à doença. Recentemente, Mauriello et al. (2013) descreveram um peptídeo inibidor da VL, o qual poderia ser utilizado para inibir a ativação inadequada do SC por essa via. Entretanto mais estudos são necessários para esclarecer essa atividade.

Recentemente, Martiny et al. (2012) relataram associação entre genótipos contendo as variantes *D*, *B* ou *C* de *MBL2* e a presença de nódulos reumatóides em pacientes com AR.

Apesar de alguns estudos apontarem para um importante papel das proteínas da via das lectinas (MBL e MASP) na etiopatogênese da AR, investigações envolvendo pacientes com AR e familiares permanecem escassas, especialmente na população brasileira.

Os dados apresentados corroboram a participação da VL no desenvolvimento da AR e salientam a importância de estudos visando o esclarecimento do papel desempenhado pela mesma tanto na fisiopatologia como na predisposição à AR.

#### 4.5 SERINA PROTEASE ASSOCIADA À MBL (MASP)

##### 4.5.1 Aspectos gerais

A primeira MASP foi descrita em 1987 por Ikeda et al., e foi denominada MASP-1. Dez anos depois, foi descrita MASP-2 (52kDa) e somente em 2001 foi identificada pelo mesmo grupo de pesquisadores a enzima MASP-3, com 42 kDa (THIEL et al., 1997; DAHL et al., 2001). A produção de MASP-1 é exclusivamente hepática, enquanto MASP-3 é produzida em diversos outros órgãos, além do fígado. Já a MASP-2 é produzida em grande quantidade no fígado, porém existem evidências da sua produção também em tecidos cerebrais (THIEL, 2007b).

Ao contrário do que sugere seu nome, as MASPs podem formar complexos proteolíticos ativos não só na presença de MBL, como também com as ficolinas M, L e H (LIU et al., 2005; MATSUSHITA et al., 2001; MATSUSHITA et al., 2002).

Existem duas linhagens filogenéticas para os homólogos de MASP, sendo MASP-1 a forma ancestral da enzima e MASP-2, MASP-3, C1r e C1s linhagens derivadas da mesma (MATSUSHITA et al., 1992, THIEL et al., 1997). Dentre as MASPs, a MASP-2 é a mais bem descrita e estudada até o momento, exercendo papel singular na ativação da VL, bem como no sistema de coagulação.

##### 4.5.2 Estrutura e funções

Em relação a sua estrutura e organização, as três MASPs são semelhantes entre si e à C1r e C1s, sendo compostas por 6 domínios: CUB1 (domínios C1r/C1s, Uegf e domínio ósseo morfogenético), EGF (fator de crescimento epidermal), CUB2,



CCP1 (proteína de controle do complemento), CCP2 e SP (serino protease). Os cinco primeiros domínios constituem a cadeia pesada, e o domínio SP constitui a cadeia leve da enzima.

MASP-1, MASP-3 e MAp44 são produtos do processamento do gene *MASP1* localizado no cromossomo 3q27-q28 (TAKADA et al., 1995). Já a enzima MASP-2 é codificada pelo gene *MASP2*, localizado no cromossomo 1p36.23-31 (STOVER et al., 1999). Do processamento alternativo do gene *MASP2* resulta ainda MAp19, que possui 4 aminoácidos na porção C-terminal não encontrados em MASP-2. Os produtos MASP-3, MAp44 e MAp19 parecem regular de maneira negativa a ativação do SC, entretanto o tema ainda necessita ser melhor elucidado (DAHL et al., 2001; DEGN et al., 2011).

As três MASPs se homodimerizam e se associam com dímeros, trímeros e tetrâmeros de MBL, bem como com subunidades estruturais das ficolinas, na presença de  $\text{Ca}^{2+}$ , formando predominantemente complexos 1:1 (um dímero de MASP para cada oligômero de MBL/ficolina) (CHEN, WALLIS, 2001).

A ligação de MASP-2 à MBL ocorre através do domínio EGF, assistido pelos domínios CUB (FEINBERG et al., 2003). Após a ligação da MBL/ ficolinas ao seu alvo, ocorre uma mudança conformacional e a autoativação da MASP-2 (GÁL et al., 2005). MASP-2 é capaz de ligar C4 com elevada eficiência, e C2 em menor quantidade, gerando C4b e C2b, respectivamente, componentes da C3 convertase (C4bC2b) (THIEL et al., 1997; THIEL et al., 2009).

MASP-2 e MASP-1 também possuem importante papel na ativação do SC pela via clássica. Além de possuir poder catalítico aproximadamente 1000 vezes maior que C1s, MASP-2 também é mais rapidamente inibida pelo inibidor de C1, o que aponta para a importância dessa proteína (KERR et al., 2008). Concomitantemente, estudos recentes indicam um importante papel de MASP-1 na ativação tanto de C2, como de MASP-2 (HÉJA et al., 2012; DEGN et al., 2012). Além disso, MASP-2 possui atividade semelhante ao fator Xa da cascata da coagulação, promovendo a clivagem de pró-trombina em fibrina, a qual se liga covalentemente às superfícies bacterianas (GULLA et al., 2010).

Apesar dos vários estudos existentes sobre o tema, as funções e atividades das MASPs e demais proteínas do SC ainda constituem um tema importante na investigação da imunidade inata. Neste contexto, são de grande relevância

investigações que auxiliem no esclarecimento do papel dessas proteínas nos diversos processos imunológicos.

#### 4.5.3 Polimorfismos do gene *MASP2*

Doze exons do gene *MASP2* são responsáveis por codificar a proteína MASP-2. Além de MASP-2, esse gene também é responsável por codificar MAp19. Ambas proteínas compartilham módulos proteicos codificados por partes dos exons 1 e 2 (peptídeo sinal), exon 2 e 3 (domínio CUB1) e exon 4 (domínio EGF). Já o exon 5 corresponde exclusivamente à MAp19, gerada pelo processamento alternativo e poliadenilação do transcrito primário do gene *MASP2*. Os exons 6 e 7 codificam o segundo domínio estrutural CUB1, enquanto os exons 8 e 9, 10 e 11 codificam os domínios CCP1 e CCP2, respectivamente. O exon 12 codifica o domínio SP de MASP-2 e contém a região 3' UT específica para o RNA mensageiro de MASP-2 (STOVER et al., 2001) (FIGURA 9). Conjuntamente, os 12 exons codificadores de MASP-2 correspondem à 20Kb do gene *MASP2*, cujo promotor é regulado por STAT3, IL-1b e IL-6 (UNTERBERGER et al., 2007).

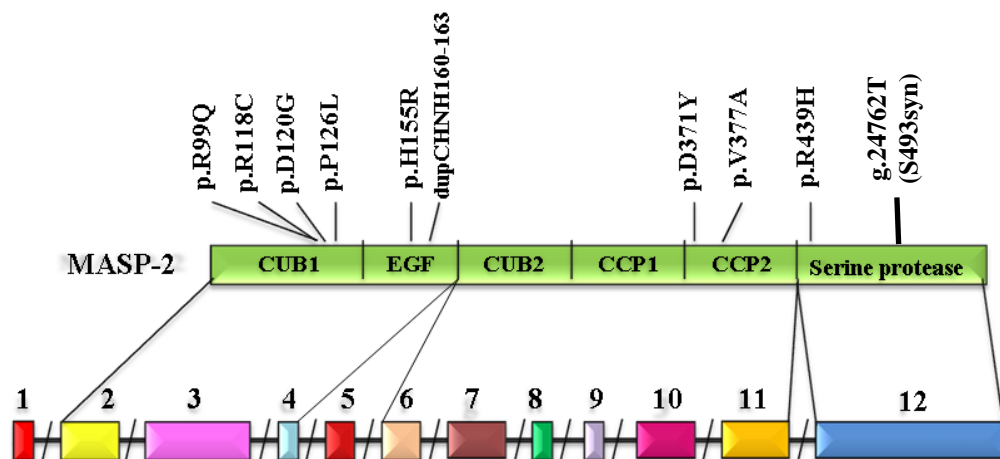


FIGURA 9 – POLIMORFISMOS DO GENE *MASP2* E LOCALIZAÇÃO NA PROTEÍNA

FONTE: BOLDT, GOELDNER, MESSIAS-REASON (2012)

LEGENDA: CUB = domínios C1r/C1s; EGF = fator de crescimento epidermal; CCP = proteína de controle do complemento.

Polimorfismos no gene *MASP2* são responsáveis por alterações das concentrações séricas de MASP-2 e na ativação do SC. Ytting et al., (2007) sugerem que as concentrações de MASP-2 em indivíduos sadios permanecem constantes ao longo da vida, porém, esse dado parece variar de acordo com a população estudada (MOLLER-KRISTENSEN et al., 2003).

O SNP *p.D120G* (rs72550870) foi o primeiro polimorfismo descrito para *MASP2* (STENGAARD-PEDERSEN et al., 2003), e corresponde à substituição de uma adenina por uma guanina no códon 120 no exon 3 (*p.D120G*, c.359A>G, códon 105 na proteína madura). Essa substituição interfere na ligação do íon cálcio no domínio CUB1 de MASP-2, impedindo a ligação entre MASP-2 e MBL/ ficolinas e diminuindo as concentrações séricas de MASP-2. A homozigose para a mutação *p.D120G* ocorre em europeus com uma frequência de 0,15% a 0,3%, e a heterozigose apresenta frequência de aproximadamente 3.6% nessa população (STENGAARD-PEDERSEN et al., 2003; SORENSEN, THIEL, JENSENIUS, 2005; THIEL et al., 2007a; VALLÈS et al., 2009).

Já em populações asiáticas, a deficiência de MASP-2 é praticamente inexistente (frequência de aproximadamente 0,001%). A deficiência de MASP-2 em chineses ocorre devido à duplicação de quatro aminoácidos no domínio EGF (*p.156\_159dupCHNH*), o que provavelmente ocasiona erro no dobramento da proteína (THIEL et al., 2007a; THIEL et al., 2009).

Em populações africanas, substituições no domínio CUB1 ocasionadas por *p.P126L* no exon 3 (rs56392418), no domínio CCP2 ocasionadas por *p.V377A* no exon 10 (rs2273346) e no domínio SP ocasionadas por *p.R439H* no exon 12 (rs12085877) são reconhecidas por reduzir as concentrações plasmáticas de MASP-2 quando em heterozigose, porém não interferem na ativação do SC que continua sendo ativado normalmente. Já a homozigose para *p.P126L* e *p.R439H* impossibilitam a ativação do SC (THIEL et al., 2007a; THIEL et al., 2009).

Existem ainda diversos outros polimorfismos em *MASP2*, dentre os quais *g.1945560C>A* na região promotora (rs7548659), *g.1961795C>T* (rs17409276) no intron 9, *p.D371Y* (rs12711521) no exon 10 e *24762T>C* (rs1782455) no exon 12, cuja prevalência varia de acordo com a população estudada (Quadro 2).

	<i>g. 1945560A</i> (rs7548659)	<i>P126L</i> (rs56392418)	<i>g. 1961795T</i> (rs17409276)	<i>D371Y</i> (rs12711521)	<i>V377A</i> (rs2273346)	<i>R439H</i> (rs12085877)	<i>D120G</i> (rs72550870)
Euro	81,9	0	16,7	85,4	0,4	0,4	3,4
Afro	9,7	14,2	10,9	9,7	15,8	13,3	0
Jap	77,9	0	13,5	72,1	16,9	0,6	nd

QUADRO 2 - FREQUÊNCIA DOS SNPS DE *MASP2* EM DIFERENTES POPULAÇÕES

FONTE: SNP DataBase (HapMap).

NOTA: nd = não determinado; Jap = população japonesa; Afro = população africana sub-saariana; Euro = população europeia.

Em estudo recente, Ferraroni et al. (2012) observaram frequência de 39% para o SNP *p.D371Y* em uma população do Rio de Janeiro. Considerando-se a diversidade étnica da população brasileira e a contribuição dos diversos SNPs para a funcionalidade de MASP-2, mais estudos são necessários para caracterizar o comportamento dos polimorfismos de *MASP2* e sua influência na população brasileira.

#### 4.5.4 Polimorfismos de *MASP2* e implicações clínicas

São raros os estudos investigando a associação entre a deficiência de MASP-2 e doenças. Os poucos estudos existentes abordam, em sua maioria, o impacto apenas das concentrações séricas e/ou do polimorfismo *p.D120G* no desenvolvimento de doenças.

Pacientes com câncer colorretal parecem apresentar concentrações séricas de MASP-2 maiores em relação a indivíduos saudáveis, sendo que as concentrações de MASP-2 também parecem estar relacionadas às taxas de recorrência do câncer e de mortalidade (YTTING et al., 2005).

Em psoríase não houve associação entre o polimorfismo *p.D120G* e o desenvolvimento da doença (STOVER et al., 2005). Já na fibrose cística, a homozigose para *p.D120G* pode atuar de maneira significativa sobre a modulação da doença pulmonar (OLSEN et al., 2006).

Em populações eurodescendentes, os indivíduos afetados pela mutação *p.D120G* são acometidos por infecções recorrentes graves e reações autoimunes (SORENSEN, THIEL, JENSENIUS, 2005). Sintomas semelhantes aos do lúpus eritematoso sistêmico já foram descritos em indivíduos homozigotos para *p.D120G*, porém a associação entre o polimorfismo e a doença ainda necessita ser investigada (STENGAARD-PEDERSEN et al., 2003). Já na população espanhola, Garcia-Orden et al., (2008) não encontraram associação entre a presença dos polimorfismos de *MASP2* e de alterações nas concentrações séricas de MASP-2, e o desenvolvimento de pneumonias.

Em relação à febre reumática e suas complicações, a presença de *p.D120G* não teve associação com o desenvolvimento da doença (SCHAFRANSKI et al., 2008b; RAMASAWMY et al., 2008).

Por sua vez, Miller et al., (2010) em estudos sobre o papel das alterações moleculares da VL nas doenças dermatológicas, descrevem o caso de uma paciente com inúmeras afecções cutâneas recorrentes e portadora do SNP *p.D120G*, bem como deficiente em MBL. De acordo com os autores, a deficiência de MBL pode estar acompanhada por outra deficiência imunológica, o que pode agravar o quadro clínico do paciente.

Seis SNPs de *MASP2* foram investigados em pacientes com doença de Chagas e suas diferentes formas clínicas (BOLDT et al., 2011b). Os autores encontraram associação entre o maior risco de desenvolver complicações cardíacas e genótipos determinantes de concentrações baixas de MASP-2, como aqueles contendo as variantes *p.P126L* e *p.V377A*.

Recentemente, um estudo investigando os polimorfismos de *MASP2* em pacientes com hanseníase identificou maior frequência do polimorfismo *p.126L*, bem como concentrações séricas significativamente diminuídas da proteína nesses pacientes. Além disso, genótipos baixo-produtores de MASP-2 parecem favorecer o desenvolvimento de formas mais graves da doença (BOLDT et al., 2013).

Esses aspectos ressaltam a importância de aliar determinações de concentrações séricas de MASP-2 e polimorfismo do gene *MASP2* em estudos de associação com diferentes doenças.

#### 4.5.5 MASP-2 na Artrite Reumatóide

São raros os estudos investigando o papel de MASP-2 na AR. Ammitzboll et al. (2011) determinaram as concentrações séricas e intra-articulares de diversas proteínas da VL em pacientes com AR e osteoartrite de origem dinamarquesa. Os resultados desse estudo sugerem que, em pacientes com AR, as proteínas da VL estudadas, dentre as quais MBL e MASP-2, parecem estar mais concentradas no líquido sinovial do que no soro desses pacientes, quando comparados a pacientes com osteoartrite. Porém, devido ao baixo número amostral, conclusões mais aprofundadas não foram estabelecidas.

Nesse contexto, a investigação dos polimorfismos de *MASP2* e *MBL2* associada as determinações séricas dessas proteínas irá contribuir para elucidar o papel dessas proteínas na fisiopatologia da AR.

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA

O presente estudo constitui uma investigação de caráter interinstitucional, realizado por meio de uma parceria entre a Faculdade Evangélica de Medicina do Paraná e o Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, tendo sido previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Sociedade Evangélica Beneficente de Curitiba (número 2171/07) (ANEXO 1).

Todos os participantes receberam os devidos esclarecimentos sobre o projeto e assinaram o termo consentimento livre e esclarecido.

## 5.2 CLASSIFICAÇÃO DO TIPO DE PESQUISA

Trata-se de um estudo observacional analítico do tipo transversal.

## 5.3 POPULAÇÃO E AMOSTRA DA PESQUISA

### 5.3.1 Pacientes

Fizeram parte do estudo 209 pacientes atendidos no Ambulatório de Reumatologia do Hospital Evangélico de Curitiba. O Ambulatório atende aproximadamente 500 pacientes com AR que são acompanhados periodicamente. Nesse mesmo serviço de atendimento são feitas intervenções cirúrgicas minimamente invasivas, além da administração de medicação intravenosa quando necessário.

Os pacientes com AR foram selecionados consecutivamente frente aos seguintes critérios de inclusão: o paciente deveria atender ao menos 4 critérios de diagnóstico estabelecidos pelo Colégio Americano de Reumatologia (ARNETT et al., 1988), ser maior de 18 anos e a idade de início da doença deveria ser maior ou igual a 16 anos. Foram rejeitados para o estudo, pacientes menores de 18 anos ou cuja idade de início da doença fosse inferior a 16 anos.

Em relação às características demográficas, 177 pacientes (84,7%) são do gênero feminino e 32 (15,3%) são do gênero masculino, com idade variando de 18 a 84 anos (mediana 53 anos) no momento da coleta. Já em relação à etnia, 161 (77,7%) eram euro-brasileiros, 47 (22,5%) afrodescendentes e 1 (0,5%) ameríndio. Em relação ao uso do tabaco, 86 (41,1%) dos pacientes são tabagistas (se consome, no mínimo, um cigarro por dia, há mais de um mês) ou ex-tabagistas (indivíduo que parou de fumar há pelo menos um mês).

Por meio da revisão de prontuários, foram levantados dados referentes à idade de início da doença (18 a 30 anos, >31- 60 anos e acima de 60 anos), duração da doença (6 a 24 meses, >2 a 10 anos, > 10 anos), classe funcional (I, II, III e IV), presença de manifestações extra-articulares como nódulos reumatóides, síndrome de Sjögren, infecções de repetição, aborto espontâneo e doença cardiovascular

(TABELA 2). Dessa forma também foram coletados demais dados clínicos e epidemiológicos.

As doenças cardiovasculares presentes nos pacientes com AR foram: estenose aórtica, insuficiência mitral, derrame pericárdico, hipertrofia ventricular esquerda e sobrecarga ventricular esquerda.

A presença de infecção de repetição foi considerada quando o paciente apresentou uma ou mais das seguintes condições em seu histórico clínico:

- Otite: 2 ou mais vezes/ano;
- Sinusite: 2 ou mais vezes /ano;
- Pneumonia: 2 ou mais vezes/ano;
- Internação por infecção grave nos últimos 10 anos;
- Histórico de abscesso cutâneo.

TABELA 2 – DADOS CLÍNICOS DOS PACIENTES COM AR

Característica clínica	Pacientes N (%)	
Autoanticorpos		
anti-CCP+	158	(75,6)
FR-IgM+	145	(69,4)
Idade de início da doença ( $\Delta$ 16-83)		
16 a 30 anos	49	(23,4)
> 30 a 60 anos	146	(69,8)
> 60 anos	14	(6,7)
Tempo de duração da doença ( $\varnothing$ =8,3 anos)		
6 a 24 meses	40	(19,1)
> 2 a 10 anos	109	(52,1)
> 10 anos	60	(28,7)
Tratamento com DMARD (196)*	154	(78,6)
Tabagismo	86	(41,1)
Classe funcional		
I	99	(47,4)
II	83	(39,7)
III	22	(10,5)
IV	5	(2,4)
Manifestações extra-articulares		
Nódulos reumatóides	17	(8,2)
Síndrome de Sjögren (164)*	49	(29,9)
Doença cardiovascular	13	(6,2)
Infecção de repetição (75)*	26	(34,7)
Aborto espontâneo (177)**	8	(4,5)

NOTA: \*= N total de pacientes com informação disponível; \*\*= N de pacientes do gênero feminino; anti-CCP = anticorpo antipeptídeo cíclico citrulinado; FR-IgM = fator reumatóide da classe IgM;  $\Delta$  = variação;  $\varnothing$  = média; DAI = doença autoimune; DMARD = Drogas antirreumáticas modificadoras de doença.



### 5.3.2 Familiares de pacientes com artrite reumatóide

Fizeram parte do estudo 200 familiares de pacientes com AR, cujo critério de inclusão foi ser familiar de 1º ou 2º grau de paciente com AR. A aplicação de um questionário validado no momento da coleta do sangue (ANEXO 2) permitiu levantar informações clínicas e epidemiológicas, relacionadas ao uso de tabaco, sintomas articulares e ocorrência de abortos (TABELA 3). Também foram registrados dados sobre doenças anteriores e/ ou atuais e medicamentos em uso.

Os familiares participantes representam 78 famílias, totalizando uma proporção de 2,6 familiares por paciente, sendo que 188 (94,0%) possuem parentesco de 1º grau com o paciente. Em relação ao gênero, 61,0% (122/ 200) dos familiares são do gênero feminino e 39,0% (78/ 200) são do gênero masculino, com idade variando entre 7 e 91 anos (mediana igual a 36,0 anos). Em relação à etnia, 154 (77,0%) eram euro-brasileiros e 46 (23%) afrodescendentes. Os familiares tabagistas ou ex-tabagistas constituem 27,5% (55/200). Dados referentes à positividade para os autoanticorpos anti-CCP e FR-IgM foram obtidos de estudos prévios com os familiares (GOELDNER, 2009; GOELDNER et al., 2010).

TABELA 3 – DADOS CLÍNICOS E SOROLÓGICOS DOS FAMILIARES

Característica	Familiares N = 200 (%)
Autoanticorpos	
anti-CCP+	11 (5,5)
FR-IgM+	16 (8,0)
Aborto espontâneo (122)*	25 (20,5)
Sintomas articulares	47 (23,5)
Doença cardiovascular	9 (4,5)
Tabagismo	57 (28,5)

NOTA: anti-CCP = anticorpo antipeptídeo cíclico citrulinado; FR-IgM = fator reumatóide da classe IgM; DAI = doença autoimune; \* = N de familiares do gênero feminino.

### 5.3.3 Grupo controle

Como grupo controle, foram estudadas amostras de 421 indivíduos voluntários e sadios, que declararam não ter familiares com AR. Esses indivíduos

eram doadores de sangue do Centro de Hematoterapia e Hematologia do Paraná e do Biobanco do Hospital Evangélico, funcionários do Hospital de Clínicas da UFPR e moradores da região metropolitana de Curitiba. Em relação aos dados demográficos, a mediana de idade para o grupo controle foi de 45 anos (variando de 19 a 89 anos) e, 85,5% (360/421) eram euro-brasileiros, 12,6% (53/421) afrodescendentes, 1,4% (6/421) ameríndios e 0,5% (2/421) orientais, todos oriundos da mesma área geográfica dos pacientes com AR. Em relação ao gênero, 81,0% (341/421) eram mulheres e 19,0% (80/421) eram homens. Os indivíduos do grupo controle foram pareados em relação ao grupo de pacientes para gênero, etnia e idade.

## 5.4 MÉTODOS

### 5.4.1 Coleta de sangue

As coletas de sangue de pacientes com AR e familiares foram realizadas no ambulatório de Reumatologia do Hospital Evangélico de Curitiba durante o período de agosto de 2007 a abril de 2009. Durante as consultas periódicas, os pacientes com AR foram convidados a trazer seus familiares para participar do estudo.

Os doadores de sangue foram convidados a participar do estudo e, durante o procedimento de doação do sangue, as amostras foram coletadas. Os demais indivíduos do grupo controle foram convidados a participar do estudo por meio de seus familiares e suas amostras foram coletadas nas dependências do Hospital ou então em suas residências.

Duas amostras de sangue foram coletadas: 5 ml de sangue venoso em frascos contendo etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e 3 ml em frasco sem anticoagulante. Os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 3.500rpm (Centrífuga Eppendorf 5416, Hamburg, Alemanha). Em seguida, as amostras sem anticoagulante foram subdivididas em 3 alíquotas de soro, e foram armazenadas à -80°C até serem utilizadas. Já as amostras com EDTA foram subdivididas em plasma e camada leuco-plaquetária, e foram armazenados à -80°C até sua utilização.

Dados clínicos e demográficos foram levantados utilizando um questionário clínico e epidemiológico validado aplicado no momento da coleta. A determinação da origem étnica dos indivíduos foi feita através do questionamento aberto em relação a

sua ascendência e também através dos aspectos físicos observados em cada indivíduo, tais como a cor da pele.

As determinações sorológicas do presente estudo foram realizadas integralmente no Laboratório de Imunopatologia Molecular do Hospital de Clínicas, UFPR. Por sua vez, as determinações de caráter genético foram parcialmente realizadas no Instituto de Medicina Tropical da Universidade de Tübingen, Alemanha. Os dados genéticos, clínicos, sorológicos e demográficos das populações estudadas se encontram nos Apêndices de 1 a 8. Devido à limitação de recursos e/ou do material biológico, determinadas análises foram realizadas em apenas uma parcela dos grupos estudados, respeitando-se o pareamento para gênero, etnia e idade.

#### 5.4.2 Quantificação da MBL sérica

Para a determinação da concentração de MBL circulante, foi empregado o método de imunoensaio enzimático (ELISA), conforme descrito por Petersen et al. (2001). Essa técnica é capaz de detectar todas as variantes de MBL. A dosagem de MBL sérica foi realizada em 196 pacientes com AR, 200 familiares e 154 controles. Valores de MBL sérica variando de 0 a 100 ng/ml foram considerados baixo produtores, entre 101 e 1000 ng/ml foram considerados com concentrações intermediárias e acima de 1000 ng/ml com concentrações altas.

A reação consiste inicialmente em adsorver uma microplaca Nunc MaxiSorp® (Nunc, Roskilde, Dinamarca) com 100 µl de solução de manana 9 g/dl (Sigma, St. Louis, EUA) diluída 1:4500 em tampão de ligação (bicarbonato de sódio 0,1 M, pH 9,6) por 18 horas a 4°C. Em seguida foi feito bloqueio por 1 hora a 25°C utilizando 100 µl de albumina humana 1 mg/ml em tampão de diluição (tris/base 20 mM, NaCl 0,1 M, 0,05% triton X,  $\text{CaCl}_2$  10 mM, 1 mg/ml albumina humana, pH 7,4). Nesta etapa, a albumina se liga aos sítios que não adsorveram a manana, evitando reações inespecíficas nas etapas seguintes. Após quatro lavagens com tampão específico (tris/base 10 mM, NaCl 0,14 M, 0,05% tween 20,  $\text{CaCl}_2$  5 mM, 0,1%  $\text{NaN}_3$  0,015 M, pH 7,4), adicionou-se aos poços 100 µl das amostras diluídas 1:100 com tampão de diluição, assim como dos padrões de concentrações conhecidas (Statens Serum Institute, Copenhagen, Dinamarca). A placa foi então incubada a 4°C por 18

horas, etapa na qual a MBL presente nas amostras se liga especificamente à manana adsorvida.

Após incubação, a placa foi lavada 4 vezes, e o anticorpo monoclonal anti-MBL humana Mab1-131 (Statens Serum Institute, Copenhagen, Dinamarca), diluído 1/1000 em tampão de diluição foi adicionado à reação. Procedeu-se nova incubação por 1 hora a 25°C seguida de lavagem. Adicionou-se à reação 100 µl do anticorpo secundário de coelho anticamundongo conjugado com fosfatase alcalina (Sigma, St. Louis, EUA), diluído à 1/2000 com tampão de diluição. Nesta etapa, o anticorpo secundário liga-se ao anticorpo primário ligado a MBL, formando um complexo. A reação ocorre em 1 hora a 25°C. O anticorpo conjugado que não se ligou ao primário foi removido por 4 lavagens com tampão específico, após as quais acrescentou-se o cromógeno (96 µl/ml de dietanolamina e 10 mg/ml de p-nitrofenolfosfato, Sigma, St. Louis, EUA) que atua como substrato da fosfatase alcalina. Após incubação de 18 horas a 25°C, a reação enzimática gera um produto cuja intensidade de cor foi aferida em um leitor de ELISA a 450nm (BIOTEK, Rio de Janeiro, Brasil).

A absorbância obtida foi proporcional à concentração de formas oligoméricas de MBL presentes nas amostras e as concentrações foram calculadas com o auxílio da curva de calibração feita com os padrões de concentrações conhecidas. Em todos os ensaios foram utilizados controles inter- e intraplacas, afim de assegurar a qualidade das reações.

O ELISA para a quantificação das concentrações séricas de MBL foi integralmente padronizado no Laboratório de Imunopatologia Molecular do Hospital de Clínicas, UFPR, e validado pelo uso de controles e curvas de calibração feitos com padrões provenientes de laboratórios que produzem kits comerciais. Concomitantemente, o método foi validado com padrões gentilmente doados por colaboradores da Universidade de Aarhus na Dinamarca, além de ter sido analisado por estudos comparativos de métodos e kits utilizados para a determinação das concentrações séricas de MBL (FRIEDERIKSEN et al., 2006).

#### 5.4.3 Genotipagem de *MBL2*

A genotipagem de *MBL2* foi realizada em 156 pacientes com AR, 120 familiares e 200 controles pela técnica de sequenciamento genômico.

Todas as amostras tiveram DNA extraído da camada leucocitária utilizando o reagente DNAzol® Genomic DNA Isolation Reagent (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). As amostras de DNA foram quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop 1000 versão 3.7.1 (Thermo Fisher Scientific, Inc., Massachusetts, EUA), e sua concentração foi determinada em 100 ng/μl quando possível. Em seguida as amostras foram armazenadas a -20°C até a amplificação.

Para a determinação dos polimorfismos presentes na região promotora de *MBL2*, foi amplificado um fragmento de 696 pares de base (pb) utilizando reação em cadeia da polimerase (PCR) com a sequência de oligonucleotídeo iniciador específico direto MBL-PromF (5'-GGCCAACGTAGTAAGAAATTTCCAGAGA-3') e reverso MBL-PromR (5'-GAGGGAGTGATGGAAACAGGGACA-3'), conforme esquematizado na FIGURA 10.

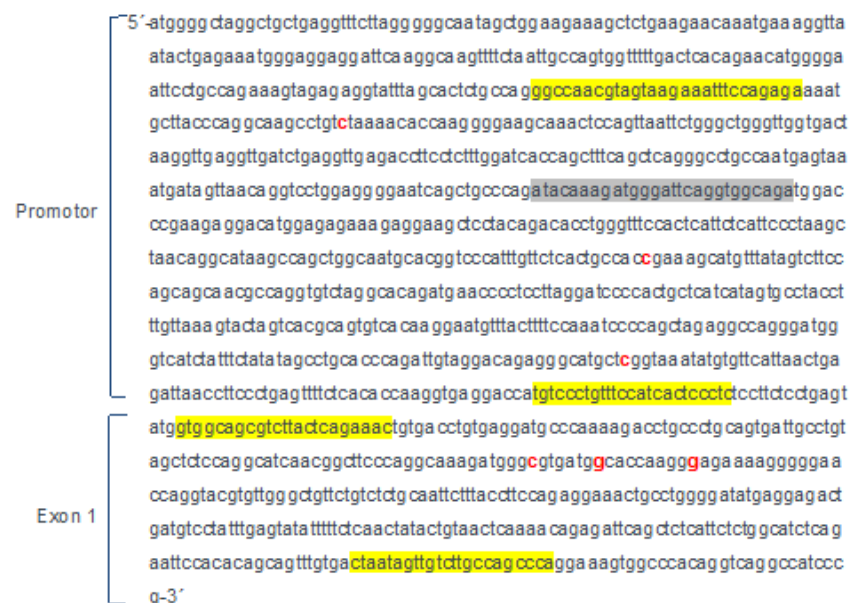


FIGURA 10 - OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS NA GENOTIPAGEM DE *MBL2*

LEGENDA: Em vermelho: SNPs investigados; em amarelo: iniciadores utilizados na amplificação das regiões de interesse; em cinza: iniciador interno utilizado no sequenciamento do SNP na posição -550pb. Sequência referência: NG\_008196.1 (sequência do GenBank).

Como meio de reação, foram utilizados tampão para PCR concentrado 10 vezes (20mM Tris-HCl pH 8,4, 50mM KCl, 1,5mM MgCl<sub>2</sub>), 0,6 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 unidade de Taq DNA Polimerase (Qiagen, Venlo, Holanda), 0.1 mM de dNTP

(Qiagen, Venlo, Holanda), 0,5  $\mu$ M de iniciador MBL-PromF, 0,5  $\mu$ M de iniciador MBL-PromR (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Alemanha), concentração média de 100 ng/ $\mu$ l de DNA genômico em água ultrapura, correspondendo a um volume total de 20 $\mu$ l. As condições de reação de PCR para a amplificação do fragmento estão esquematizadas na FIGURA 11. As reações foram realizadas em um termociclador PTC-200 (BioRad, California, EUA).

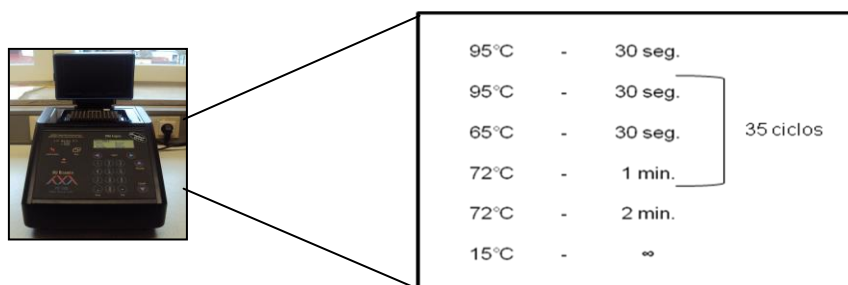


FIGURA 11 - CONDIÇÕES UTILIZADAS PARA A PCR DE AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO PROMOTORA DE *MBL2*

FONTE: O AUTOR

De maneira semelhante, foi amplificado um fragmento de 343 pb do exon 1, utilizando os iniciadores MBL-Ex1F (5'-GTGGCAGCGTCTTACTCAGAAAC-3') e o iniciador reverso MBL-Ex1R (5'-TGGGCTGGCAAGACAACACTATTAG-3'). As mesmas condições utilizadas para a amplificação da região promotora foram utilizadas para o exon 1, com exceção da temperatura de anelamento que para este foi de 61°C.

A presença dos fragmentos foi confirmada por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, usando como orientação o padrão de 100 pb DNA Ladder (Life Technologies, Carlsbad, EUA). A interpretação foi baseada no padrão de bandas coradas com Sybr®Green I (Applied Biosystems, Foster City, EUA) que se liga à fita de DNA, tornando-se fluorescente sob luz azul (FIGURA 12).

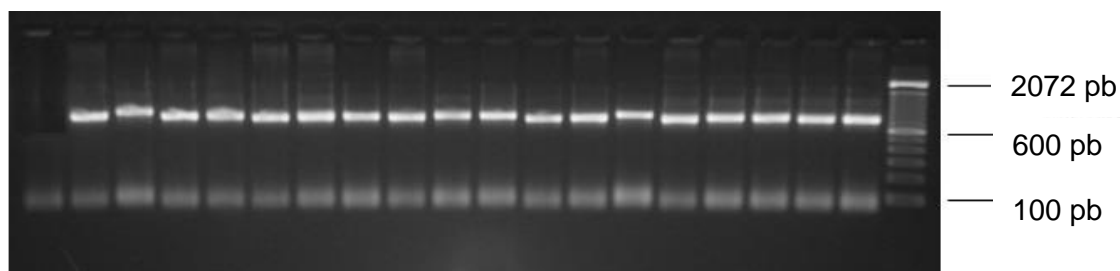


FIGURA 12 – PRODUTO DE AMPLIFICAÇÃO DO PROMOTOR DE *MBL2*

Após a confirmação da presença dos fragmentos desejados, o produto de amplificação foi purificado, visando eliminar resquícios de reagentes e impurezas. Para tal, foi empregado o kit illustra™ GFX™ PCR and Gel Band Purification (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido). Após a purificação, foi realizada nova eletroforese em gel de agarose, juntamente com um marcador de peso e massa molecular, a fim de verificar a recuperação do produto amplificado e determinar a quantidade a ser utilizada na reação de sequenciamento.

Em seguida foi realizada a reação de sequenciamento dos produtos amplificados de acordo com o esquema na FIGURA 13. Para os fragmentos da região promotora foram realizadas duas reações: uma utilizando o iniciador MBL-PromR e outra utilizando o iniciador interno reverso (5'-TCTGCCACCTGAATCCCATCTTTGTATC-3'). Para o sequenciamento do exon 1 foi realizada uma única PCR utilizando o iniciador MBL-Ex1F.

As reações de sequenciamento foram realizadas com o kit BigDye® Terminator v.1.1 seguindo as recomendações do fabricante (Applied Biosystems, Foster City, California, EUA) e utilizando 0,5 µM de iniciador, 1,0 a 3,0 µl do produto amplificado, dependendo da qualidade da banda do produto purificado, e água ultrapura totalizando um volume final igual a 10µl. O produto da reação de sequenciamento foi então purificado utilizando colunas de Sephadex G-50 Fine DNA Grade™ (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido).

As amostras foram sequenciadas no aparelho automatizado ABI Prism 3130 XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, EUA). O sequenciamento foi realizado pelo método de terminação de cadeia segundo Sanger, Nicklen, Coulson (1977), através da incorporação de didesoxinucleotídeos fluorescentes (ddNTPs). Os eletroferogramas resultantes foram analisados nos programas Geneious Basic® v5.6.6 (Biomatters Ltd, Auckland, Nova Zelândia) e CodonCode Aligner 3.7.1 (CodonCode Corporation, Massachusetts, EUA).

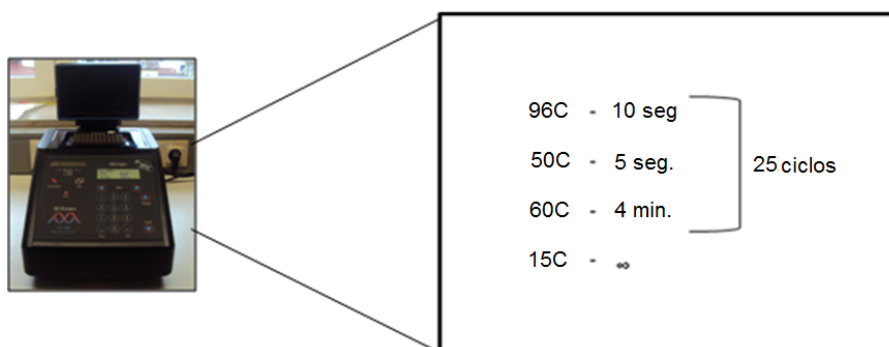


FIGURA 13 - CONDIÇÕES PARA A REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO DE *MBL2*  
 FONTE: O AUTOR

#### 5.4.4 Quantificação de MASP-2 plasmática

A quantificação de MASP-2 foi realizada em 156 pacientes com AR, 44 familiares e 100 controles. Para a quantificação de MASP-2 no plasma foram empregados kits de ELISA (HUMAN MASP-2 ELISA Kit, Cell Sciences, Canton, EUA). A concentração mínima detectada pelo kit é de 1,6 ng/ml.

As amostras foram inicialmente diluídas 1:40 em tampão de diluição fornecido pelo fabricante, e em seguida foram aplicadas nos poços de poliestireno sensibilizados com anticorpo anti-MASP-2. Após a incubação por uma hora a 25°C, os poços foram lavados e incubados com anticorpo biotilado por uma hora a 25°C. Em seguida os poços foram lavados e a solução de estreptavidina conjugada com peroxidase foi aplicada e incubada por uma hora a 25°C. Após nova lavagem, foi acrescentado o substrato para a peroxidase, tetrametilbenzidina, com incubação de 30 minutos a 25°C. Ao término da incubação, a reação foi interrompida com a solução de ácido oxálico e a leitura da coloração gerada foi realizada em 450 nm.

As concentrações de MASP-2 foram calculadas à partir da curva padrão gerada pelos padrões de concentração conhecida fornecidos pelo fabricante e aplicados concomitantemente com as amostras.



#### 5.4.5 Genotipagem de *MASP2*

A genotipagem de *MASP2* foi realizada em 156 pacientes com AR, 111 familiares e 230 controles.

Para a determinação dos polimorfismos presentes na região promotora (-175pb do sítio de início da transcrição do exon 1) e nos exons 3 (*p.R99Q*, *p.D120G*, *p.P126L*), 10 (*p.D371Y*, *p.V377A*) e 12 (*p.R439H*, *24762T>C*), bem como no intron 9 (+16060pb) do gene *MASP2*, foi utilizada a técnica de PCR-SSP (BOLDT, PETZLER, 2002; BOLDT et al., 2006). A PCR do tipo multiplex é uma variante da PCR tradicional, na qual um ou mais *loci* são simultaneamente amplificados na mesma reação, economizando tempo e recursos. Na PCR-SSP, o nucleotídeo da extremidade 3' do iniciador deve ser perfeitamente complementar à fita molde, caso contrário, não haverá amplificação. Assim, os iniciadores são desenhados de maneira que sua extremidade 3' seja complementar à variante polimórfica de interesse, sendo dessa forma possível identificar os SNPs.

Três reações de PCR-SSP abrangendo todos os polimorfismos de interesse e previamente padronizadas foram utilizadas para a tipagem dos SNPs de *MASP2* (BOLDT et al., 2011a). As reações Multiplex I e II foram compostas por 7 pares de iniciadores capazes de gerar fragmentos específicos. Já a reação *p.D120G* contou com um total de 5 iniciadores capazes de gerar até dois fragmentos específicos por reação. Os iniciadores utilizados nas reações constam na TABELA 4 e foram desenhados de acordo com a sequência *NT\_021937* do cromossomo 1 (sequência do GenBank).

TABELA 4 - SEQUÊNCIAS DE INICIADORES PARA GENOTIPAGEM DE *MASP2*

PCR-SSP	Iniciador direto*	Sequência 5'-3'	Iniciador reverso*	Sequência 5'-3'	Fragmento (pb)
Multiplex I	FCN1 Prom_1981Af	CCCATGAGCCTGGTTATCA	FCN1 Promr	ACCTCCTCTTCCTTGCAACA	729
	FCN1 Prom_1981Gf	CCCATGAGCCTGGTTATCG			
	FCN2 Ex8f <sup>a</sup>	CCAGGCCTCAGGTATAAAG	FCN2 Ex8r <sup>a</sup>	AAAGGGTTGATTGCGGAAAC	500
	MASP2 In9_+16060Cf	CAGCACACCTCTTCCTCC	MASP2 Ex10_377Vr	GGACCTGTGATGTACTCCA	344
	MASP2 In9_+16060Tf	CAGCACACCTCTTCCTCT	MASP2 Ex10_377Ar	GGACCTGTGATGTACTCCG	
	MASP2 Ex3_99Rf	GAGCACAGACACGGAGCG	MASP2 Ex3_126Pr	CCTCGAACCCCGTGAACG	117-119
	MASP2 Ex3_99Qf	AGAGCACAGACACGGAGCA	MASP2 Ex3_126Lr	GCCTCGAACCCCGTGAACA	
Multiplex II	MASP2 Prom_-175Af	GTCCGACTCCTGGCTCCA	MASP2 Ex3_126Pr	CCTCGAACCCCGTGAACG	827-828
	MASP2 Prom_-175Cf	TCCGACTCCTGGCTCCC	MASP2 Ex3_126Lr	GCCTCGAACCCCGTGAACA	
	FCN2 Ex8f <sup>a</sup>	CCAGGCCTCAGGTATAAAG	FCN2 Ex8r <sup>a</sup>	AAAGGGTTGATTGCGGAAAC	500
	MASP2 In9_+16060Cf	CAGCACACCTCTTCCTCC	MASP2 Ex10_371Yr	TCGGCCACTGGGTAGATA	324
	MASP2 In9_+16060Tf	CAGCACACCTCTTCCTCT	MASP2 Ex10_371Dr	TCGGCCACTGGGTAGATC	
	MASP2 Ex12_439Rf	TGTGGACTATCAGCCCCG	MASP2 Ex12_S493Gr	ATTCGAATGTCCAGGGCG	197
	MASP2 Ex12_439Hf	TGTGGACTATCAGCCCA	MASP2 Ex12_S493Ar	ATTCGAATGTCCAGGGCA	
			MASP2 Ex3_120Dr	GCTTCTCGTTGGAGTAGT	
p.D120G	MASP2 Promf	CAGGTCACTGGACAAACAGATCA	MASP2 Ex3_120Gr	GCTTCTCGTTGGAGTAGC	695
	MBLPromf <sup>b</sup>	ATGGGGCTAGGCTGCTGAG	MBLrev+270 <sup>b</sup>	CCAACACGTACCTGGTTCCC	1059

NOTA: <sup>a</sup> = iniciadores utilizados na amplificação do controle endógeno (gene *FCN2*); <sup>b</sup> = iniciadores utilizados na amplificação do controle endógeno (gene *MBL2*); f = *forward*; r = *reverso*; pb = pares de base; Prom = promotor; In = intron; Ex = exon; em negrito: nucleotídeo variante. A multiplex I incluiu a coamplificação de um fragmento específico para a variante -1981 A>G no promotor do gene *FCN1* (ficolina 1). \* = nomenclatura dos iniciadores: nome do gene+localização da variante (In = intron, Ex = exon, Prom = promotor)+variante identificada pelo iniciador.

Os reagentes utilizados para cada PCR, assim como seus volumes, encontram-se listados nos Apêndices 9, 10 e 11.

As seguintes condições de desnaturação e extensão foram utilizadas para as três reações de PCR-SSP, respectivamente: 15 segundos/ 94°C e 5 minutos/ 72°C. As temperaturas de acoplamento foram diferentes para cada reação e, de acordo com a estratégia de ciclagem abordada, as mesmas diminuíam a cada 10 ciclos, o que garantiu a especificidade e quantidade do produto amplificado. As temperaturas de acoplamento utilizadas para cada reação foram:

- Multiplex I: 60°C - 56°C - 52°C;
- Multiplex II: 62 °C - 58 °C - 54°C;
- *p.D120G*: 58°C - 57°C - 56°C.

Em todas as reações foram incluídos controles endógenos e controles negativos (soluções idênticas às usadas nas reações, porém sem DNA). Na reação multiplex I foram ainda adicionados iniciadores para a identificação de um SNP do gene *FCN1*, não relacionado ao presente estudo.

A análise dos resultados da amplificação foi realizada através de eletroforese em gel de agarose a 1,0%. A interpretação foi baseada no padrão de bandas coradas com corante Sybr®Safe (Life Technologies, Carlsbad, EUA), as quais se tornam fluorescentes sob luz azul. A leitura foi baseada na análise do padrão eletroforético dos fragmentos amplificados indicados na FIGURA 14.

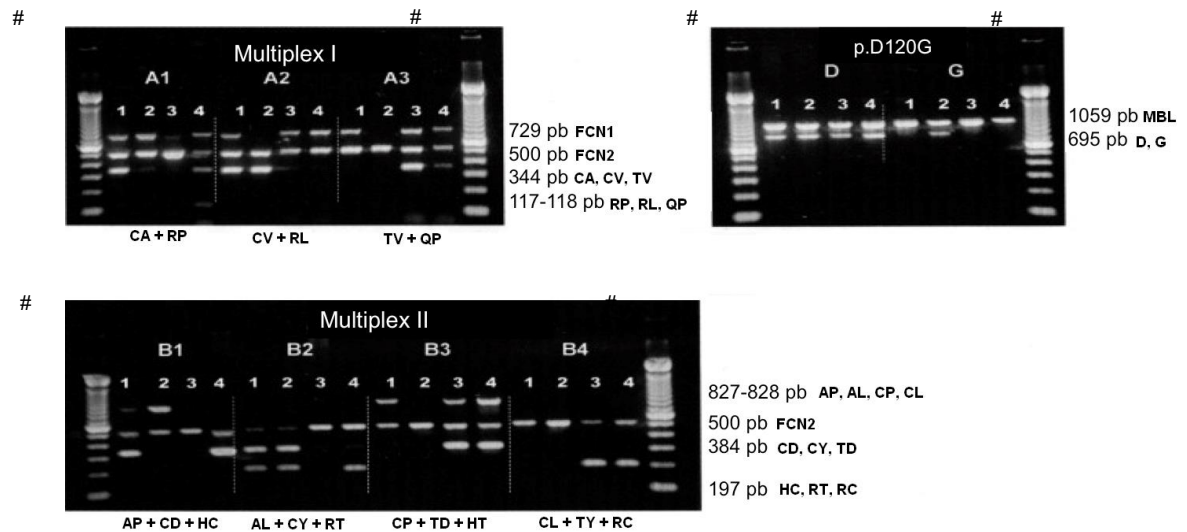


FIGURA 14 – PADRÕES ELETROFORÉTICOS DAS PCRs-SSP PARA MASP2

FONTE: Adaptado de BOLDT et al. (2011a)

LEGENDA: # = Marcador de pares de base (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, EUA).

NOTA: Os meios de reação foram compostos dos seguintes iniciadores: Af, Cf, Ar, Rf e Pr (A1); Af, Cf, Vr, Rf e Lr (A2); Gf, Tf, Vr e Qf (A3); Dr, MASP2 Promf, MBL Promf e rev+270 (D); Gr, MASP2 Promf, MBL Promf e rev+270 (G); Af, Pr, Cf, Dr, Hf e Cr (B1); Af, Lr, Cf, Yr, Rf, e Tr (B2); Cf, Pr, Tf, Dr, Hf e Tr (B3); Cf, Lr, Tf, Yr, Rf, e Cr. O iniciador FCN1 Promr foi incluído em todos os meios A. Os iniciadores FCN2 ex8f e FCN2 ex8r foram incluídos em todos os meios A e B. A interpretação dos genótipos é: 1) ARDPCYRT/CRDPCDART (2B2Ai/2A2-I); 2) ARDPCYVRT/ARGPCYVRT (2B2A-i/2B2B-I); 3) CRDPTDVRC/CRDPTDVRC (1B1-h/1B1-h); 4) CRDPCDART/CRDPTDVRC (2A2-I/1B1-h).

#### 5.4.6 Análise estatística

Dados clínicos e demográficos foram analisados utilizando o programa GraphPad Prism 3.0 (GraphPad Software, Inc., Califórnia, EUA). A análise pelo teste de Shapiro-Wilk permitiu rejeitar a condição de normalidade das variáveis estudadas. Assim, as comparações entre medianas foram feitas através dos testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis. A estatística descritiva em relação às concentrações séricas de MBL e MASP-2 foi apresentada em mediana.

As frequências alélicas, haplotípicas e genótípicas foram determinadas por contagem direta. A hipótese de equilíbrio de Hardy Weinberg, segundo Guo e Thompson (2002), foi testada utilizando o programa ARLEQUIN v.3.5 (EXCOFFIER, 2010).

Para as análises de associação foram realizados testes de independência entre as variáveis utilizando os testes do chi-quadrado ou teste de Fisher bicaudal, conforme adequado. Quando apropriado, foi calculado o *odds ratio*, com intervalo de confiança de 95%. Para as análises de regressão logística binária foi utilizado o programa STATA 9.2 (STATACorp, Texas, EUA, respectivamente). Foram considerados significativos valores de *p* menores que 0,05.

Com o objetivo de facilitar análises e associações, os três SNPs no exon 1 de *MBL2* foram coletivamente denominados *O*, enquanto os alelos selvagens desses *loci* foram chamados *A*. Essas variantes, em associação com a variante *X/Y* da região promotora formam 6 genótipos: *YA/YA*, *XA/YA*, *YA/YO*, *XA/XA*, *XA/YO* e *YO/YO*.

## 6 RESULTADOS

Os dados moleculares, clínicos, sorológicos e demográficos de pacientes com AR, familiares e grupo controle encontram-se relacionados nos Apêndices de 1 a 8.

### 6.1 *MBL2*

#### 6.1.1 Frequências alélicas, haplotípicas e genótípicas

Na tabela 5 se encontram as distribuições dos genótipos e alelos de *MBL2* em pacientes, familiares e controles, bem como as análises entre grupos.

As frequências genótípicas de *MBL2* para cada *locus* e para haplótipos completos estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg nos pacientes com AR e controles. O *locus* correspondente ao codon 54 (variante *B*) apresentou desequilíbrio para o grupo de familiares investigados ( $P < 0,05$ ).

Oito haplótipos de *MBL2* foram identificados em pacientes, familiares e controles: *HYP A*, *LYP B*, *LXP A*, *LYQ A*, *LYP A*, *HYP D*, *LYQ C* e *LYP D*. O haplótipo recombinante *LYP D* foi encontrado apenas no grupo controle.

A presença de *LYP B* aumentou em 3,10 vezes o risco de AR (OR=3,10 [95%IC1,55-6,16]  $P=0,001$ ; TABELA 5). Os sete haplótipos de *MBL2* mais frequentes foram agrupados de acordo com seu perfil de produção de MBL sérica da seguinte forma: alto produtores (*HYP A*, *LYQ A* e *LYP A*) e baixo produtores (*LXP A*, *HYP D*, *LYP B* e *LYQ C*). Os haplótipos associados à baixa produção de MBL foram mais frequentes em pacientes com AR quando comparados aos familiares (OR=1,44 [95%IC1,01-2,1]  $P=0,038$ ). Entretanto não foi observada significância diante da correção para idade, gênero, etnia e uso de tabaco.

Considerando todas as variantes do exon 1 (alelo O), houve aumento significativo no risco para AR no modelo genético dominante (OR=1,29 [95%IC1,03-1,6]  $P=0,026$ ; TABELA 6), embora no modelo alélico a contribuição tenha apresentado apenas tendência à significância (OR=1,2 [95%IC1,0-1,4]  $P=0,058$ ). Não houve diferença significativa entre pacientes e controles, assim como pacientes

e familiares, para as outras variantes estudadas. As análises foram corrigidas para idade, gênero, etnia e uso de tabaco.

A variante A do exon 1 teve maior frequência em controles quando comparados aos pacientes (OR=0,67 [95%IC0,48-0,94] P=0,021), porém não foi observada significância diante da correção para idade, gênero, etnia e uso de tabaco.

TABELA 5 - DISTRIBUIÇÃO E COMPARAÇÃO DOS HAPLÓTIPOS DE *MBL2* (N [%]) EM PACIENTES, FAMILIARES E CONTROLES

Haplótipos <i>MBL2</i>	Pacientes N=312	Familiares N=240	Controles N=400	Pacientes vs. Controles		Familiares vs. Controles	
				<i>P</i> <sup>#</sup>	OR (95%IC)	<i>P</i> <sup>#</sup>	OR (95%IC)
<i>HYPA</i>	80 (25,6)	71 (29,5)	114 (28,4)	NS		NS	
<i>LYQA</i>	53 (17,0)	44 (18,3)	79 (19,8)	NS		NS	
<i>LYPA</i>	27 (8,7)	30 (12,5)	32 (8,0)	NS		NS	
<i>LXPA</i>	55 (17,6)	29 (12,1)	82 (20,5)	NS		NS	
<i>HYPD</i>	22 (7,0)	15 (6,3)	23 (5,7)	NS		NS	
<i>LYPB</i>	65 (20,9)	41 (17,1)	59 (14,8)	<b>0,001</b>	<b>3,10 (1,55-6,16)</b>	NS	
<i>LYQC</i>	10 (3,2)	10 (4,2)	9 (2,3)	NS		NS	
<i>LYPD</i>	0	0	2 (0,5)	NA		NA	
<i>Alta expressão<sup>a</sup></i>	160 (51,3)	144 (60,0)	225 (56,3)				
<i>Baixa expressão<sup>b</sup></i>	152 (48,7)	96 (40,0)	173 (43,2)	NS		NS	

LEGENDA: As análises referentes a pacientes vs. familiares resultaram em não significância. <sup>a</sup> = *LYPA*+*LYQA*+*HYPA*; <sup>b</sup> = *LYQC*+*LXPA*+*HYPD*+*LYPB*; NS = não significativo; NA = não aplicável; <sup>#</sup> valores de P foram calculados por regressão logística e corrigidos para idade, gênero, etnia e uso de tabaco.



TABELA 6 – DISTRIBUIÇÃO E COMPARAÇÃO DOS GENÓTIPOS E ALELOS DO EXON 1 DE *MBL2* (N [%]) EM PACIENTES, FAMILIARES E CONTROLES

SNP	Genótipos	Pacientes N=156 (%)	Familiares N=120 (%)	Controles N=200 (%)	Pacientes vs. Controles		Familiares vs. Controles	
					<i>P</i> <sup>#</sup>	OR (95%IC)	<i>P</i> <sup>#</sup>	OR (95%IC)
<b>Exon1 (codon52+54+57)</b>								
	AA	75 (48,1)	62 (51,7)	119 (59,5)				
	AO	73 (46,8)	58 (48,3)	73 (36,5)				
	OO	8 (5,1)	0	8 (4,0)				
	A	223 (71,4)	182 (75,8)	311 (77,8)				
	O	89 (28,6)	58 (24,2)	89 (22,2)	0,058	1,2 (1,0-1,4)	ns	
Dominante <sup>a</sup>					<b>0,026</b>	<b>1,29 (1,03-1,6)</b>	ns	
Recessivo <sup>b</sup>					ns		ns	

NOTA: As análises referentes a pacientes vs. familiares resultaram não significantes. ns = não significativo; # = valores de P foram calculados por regressão logística e corrigidos para idade, gênero, etnia e tabagismo. Modelo genético dominante (<sup>a</sup>): O/O + O/A vs. A/A; Modelo genético recessivo (<sup>b</sup>): O/O vs. A/A + O/A.

### 6.1.2 Associação entre haplótipos de *MBL2* e características clínicas e sorológicas de pacientes com AR e familiares

Os haplótipos de *MBL2* foram analisados em pacientes e familiares em relação à positividade para os anticorpos anti-CCP e FR-IgM, bem como em relação à presença de nódulos reumatóides, síndrome de Sjögren e classe funcional.

O haplótipo *LXPA* teve frequência elevada nos pacientes anti-CCP positivos em relação aos pacientes negativos para esse anticorpo (OR=2,42 [95%IC1,04-5,60] P=0,036; TABELA 7). Entretanto, não foi observada significância após correção para gênero, etnia e idade. Não houve associação entre os haplótipos de *MBL2* e a positividade para o FR-IgM, anti-CCP, presença de nódulos reumatóides, síndrome de Sjögren ou as classes funcionais dos pacientes com AR.

Dentre os familiares de pacientes com AR genotipados para *MBL2*, 24,2% (29/120) apresentavam sintomas articulares sugestivos de AR no momento da coleta e 75,9% (44/58, P<0,0001) deles apresentam menos uma variante relacionada a concentrações baixas de MBL formando seu genótipo. Essas variantes foram: *LYPB* (N=11), *LXPA* (N=7), *HYPD* (N=4) e *LYQC* (N=3).

TABELA 7 - FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS DE *MBL2* (N [%]) EM PACIENTES E FAMILIARES DE ACORDO COM CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E SOROLÓGICAS

Haplótipos <i>MBL2</i>	Familiares		Pacientes						
	anti-CCP +	FR-IgM +	anti-CCP +	FR-IgM +	Nódulos	Sjögren	Classe funcional		
	N=18	N=26	N=238	N=216	N=22	N=74	I	II	III+IV*
							N=150	N=126	N=36
<i>HYP A</i>	5 (27,8)	7 (26,9)	60 (25,2)	54 (25,0)	9 (40,9)	13 (17,6)	34 (22,7)	35 (27,8)	11 (30,6)
<i>LYQA</i>	3 (16,7)	1 (3,8)	38 (16,0)	40 (18,5)	3 (13,6)	12 (16,2)	30 (20,0)	18 (14,3)	5 (13,9)
<i>LYPA</i>	3 (16,7)	1 (3,8)	22 (9,2)	20 (9,2)	0 (0)	8 (10,8)	12 (8,0)	12 (9,5)	3 (8,0)
<i>LXPA</i>	1 (5,6)	7 (26,9)	<b>48 (20,2)<sup>a</sup></b>	37 (17,1)	7 (31,8)	16 (21,6)	25 (16,7)	24 (19,0)	6 (16,7)
<i>HYPD</i>	1 (5,6)	2 (7,7)	16 (6,7)	16 (7,4)	1 (4,5)	5 (6,8)	11 (7,3)	9 (7,1)	2 (5,6)
<i>LYPB</i>	5 (27,8)	7 (26,9)	48 (20,2)	42 (19,4)	2 (9,1)	16 (21,6)	36 (24,0)	23 (18,2)	6 (16,7)
<i>LYQC</i>	0 (0)	1 (3,8)	6 (2,5)	7 (3,2)	0 (0)	4 (5,4)	2 (1,3)	5 (4,0)	3 (8,3)

NOTA: <sup>a</sup> = pacientes anti-CCP+ vs. pacientes anti-CCP- (OR=2,42 [95%IC1,04-5,60] P=0,036; \* = as classes funcionais III e IV foram agrupadas devido ao baixo N em cada; N = número de cromossomos; anti-CCP = anticorpo antipeptídeo cíclico citrulinado; FR-IgM = fator reumatóide da classe IgM. Em negrito: haplótipos com diferenças significativas.

### 6.1.3 Concentrações séricas de MBL nos grupos em estudo

As concentrações séricas de MBL variaram de  $\leq 100$  ng/ml a 6640 ng/ml (IQR=1568 ng/ml) nos pacientes com AR, de  $\leq 100$  ng/ml a 5800 ng/ml (IQR=1981 ng/ml) nos familiares e de  $\leq 100$  ng/ml a 4500 ng/ml (IQR=1870) nos controles (APÊNDICES 1,4,7 e 8).

As concentrações séricas de MBL foram significativamente inferiores nos pacientes com AR em comparação ao grupo controle (medianas 550,5 vs. 1022,9 ng/ml, respectivamente, Mann-Whitney  $P=0,0039$ , GRÁFICO 1). Concentrações séricas baixas de MBL aumentaram em 4,54 vezes o risco para AR (OR=4,54 [95%IC2,33-8,82]  $P<0,0001$ ).

Em relação aos familiares, as concentrações séricas de MBL foram significativamente superiores em comparação aos pacientes (medianas 890 vs. 550,5 ng/ml, respectivamente, Mann-Whitney  $P=0,0071$ ), porém sem diferença significativa em relação aos controles (GRÁFICO 1).

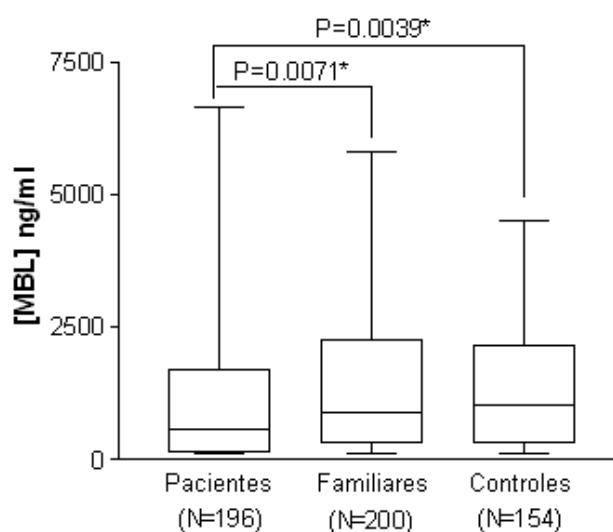


GRÁFICO 1 - CONCENTRAÇÕES DE MBL NOS GRUPOS EM ESTUDO

NOTA: \* = Teste não paramétrico de Mann-Whitney; a distribuição das concentrações está representada em mediana e interquartil.

Um total de 25,5% (50/196) dos pacientes apresentou concentrações de MBL  $\leq 100$  ng/ml, com diferença significativa em relação aos demais grupos em estudo [16,5% (33/200) familiares; 18,2% (28/154) grupo controle;  $P = 0,0312$ ; GRÁFICO 2].

Concentrações intermediárias de MBL foram detectadas em 34,7% (68/196) dos pacientes, sem diferença significativa em relação aos familiares e controles [38,5% (77/200) e 31,2% (48/154), respectivamente]. Embora a frequência de concentrações elevadas de MBL nos pacientes com AR (39,8%, 78/196) seja inferior à de familiares (45,0%, 90/200) e controles (50,6%, 78/154;  $P=ns$ ), não houve diferença significativa entre os grupos (GRÁFICO 2).

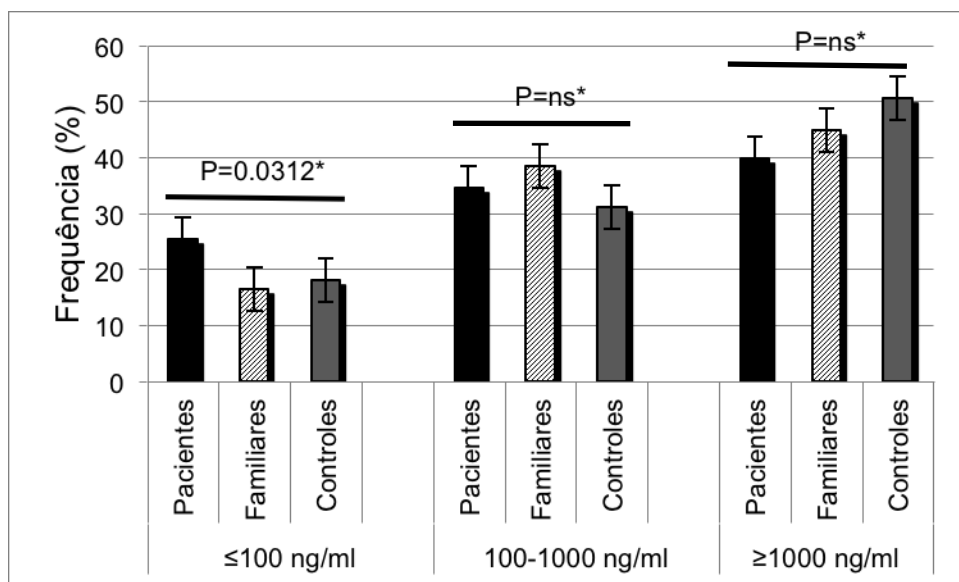


GRÁFICO 2 - DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS ESTUDADOS DE ACORDO COM A CONCENTRAÇÃO DE MBL

NOTA: \* = Teste Chi-quadrado. Cut-off de acordo com Luz et al. (2009).

Houve diferença significativa entre essas concentrações de acordo com diferentes haplótipos de *MBL2* em pacientes com AR, assim como nos familiares ( $P<0,0001$ ; GRÁFICO 3).

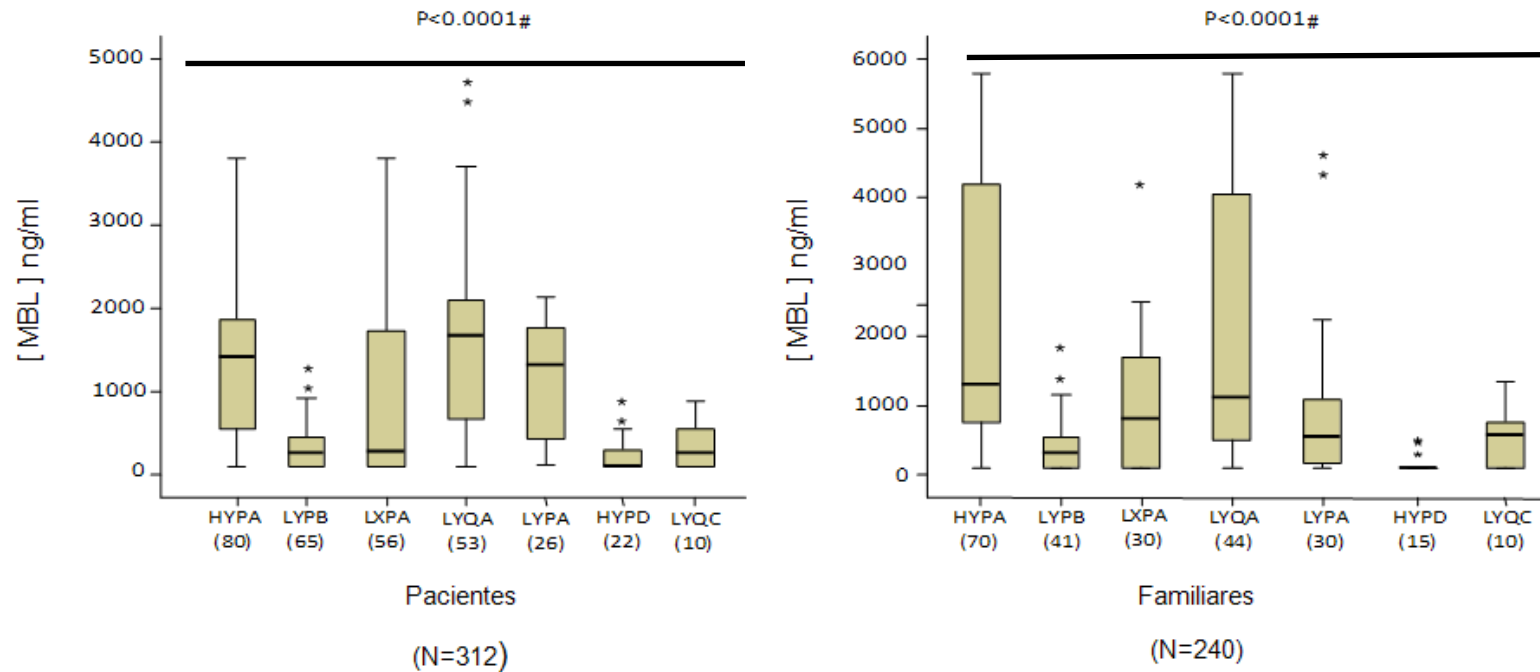


GRÁFICO 3 - DISTRIBUIÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE MBL EM RELAÇÃO AOS DIFERENTES HAPLÓTIPOS DE *MBL2*

NOTA: # = Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis; a distribuição das concentrações está representada em mediana e interquartil; \* = dosagem fora do intervalo interquartil.

Diplótipos de *MBL2* foram construídos a partir da variante -221X/Y na região promotora, e das variantes no exon 1 (Codons 52+54+57, A/O). Esses diplótipos foram subdivididos em alto (YA/YA), intermediário (YA/YO, XA/XA e XA/YA) e baixo produtores de MBL (YO/YO, XA/YO). Houve diferença significativa entre as concentrações de MBL para os diferentes diplótipos nos pacientes e familiares ( $P < 0,0001$ ; GRÁFICO 4). Além disso, pacientes com AR apresentaram maior frequência de diplótipos baixo produtores em relação aos familiares (28/156; 17,9% vs. 9/120, 7,5%;  $P = 0,0125$ ).

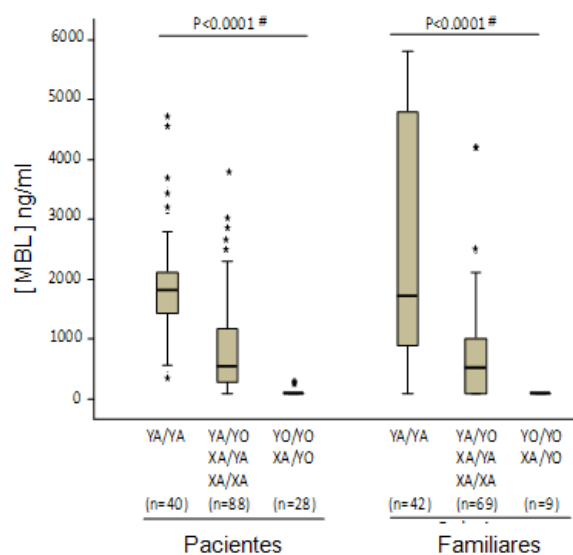


GRÁFICO 4 - DISTRIBUIÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE MBL EM RELAÇÃO AOS DIFERENTES DIPLÓTIPOS DE *MBL2*

NOTA: # = Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis; a distribuição das concentrações está representada em mediana e interquartil, \* = dosagem fora do primeiro e terceiro quartil.

#### 6.1.4 Associação entre concentrações de MBL e características clínicas e sorológicas de pacientes com AR e familiares

Não houve associação entre as concentrações séricas de MBL e a presença de síndrome de Sjögren, nódulos reumatóides ou classe funcional nos pacientes com AR. De forma semelhante, não houve associação entre o uso de tabaco e as concentrações séricas de MBL em pacientes e familiares.

A mediana das concentrações de MBL em pacientes com doença cardiovascular foi superior àquela dos pacientes sem essa característica, entretanto não houve diferença significativa (1446 ng/ml vs. 532 ng/ml, respectivamente,  $P=ns$ ). Não houve associação com a positividade para os anticorpos anti-CCP e FR-IgM.

Houve diferença significativa entre a mediana das concentrações de MBL em pacientes com histórico de abortos (4,5%, 8/177) e sem essa característica (100 ng/ml vs. 675 ng/ml, respectivamente,  $P=0,0021$ ). Concentrações baixas de MBL aumentaram o risco de aborto entre pacientes ( $OR=0,1$  [95%IC0,02-0,54]  $P=0,007$ ). De maneira semelhante, pacientes com histórico de infecções de repetição (33,8%, 25/74) apresentaram mediana inferior para as concentrações séricas de MBL em relação aos pacientes sem a característica (400 ng/ml vs. 900 ng/ml, respectivamente,  $P=0,0206$ , GRÁFICO 5). Entretanto não foi observada significância após correção para gênero.

Dentre os familiares com sintomas articulares, 21,3% (10/47) apresentavam concentrações baixas de MBL, 57,4% (27/47) concentrações intermediárias e 21,3% (10/47) concentrações elevadas de MBL ( $P=0,0137$ ). A mediana de MBL sérica nos familiares com sintoma articular foi significativamente inferior a mediana dos familiares sem sintomas articulares (520 ng/ml vs. 1053 ng/ml;  $P=0,0022$ ; teste de Mann Whitney, GRÁFICO 5).

De maneira semelhante aos pacientes, não houve diferença estatisticamente significativa entre as concentrações de MBL de familiares com e sem doença cardiovascular, apesar da mediana nesses também ser superior (2100 ng/ml vs. 884 ng/ml, respectivamente,  $P=ns$ ). Ainda nos familiares, não houve associação entre as concentrações de MBL e a positividade para anti-CCP e FR-IgM, assim como entre a ocorrência de abortos espontâneos e as concentrações de MBL, apesar de familiares com essa característica terem apresentado mediana inferior para as concentrações da proteína (770 ng/ml vs. 884 ng/ml,  $P=ns$ ).



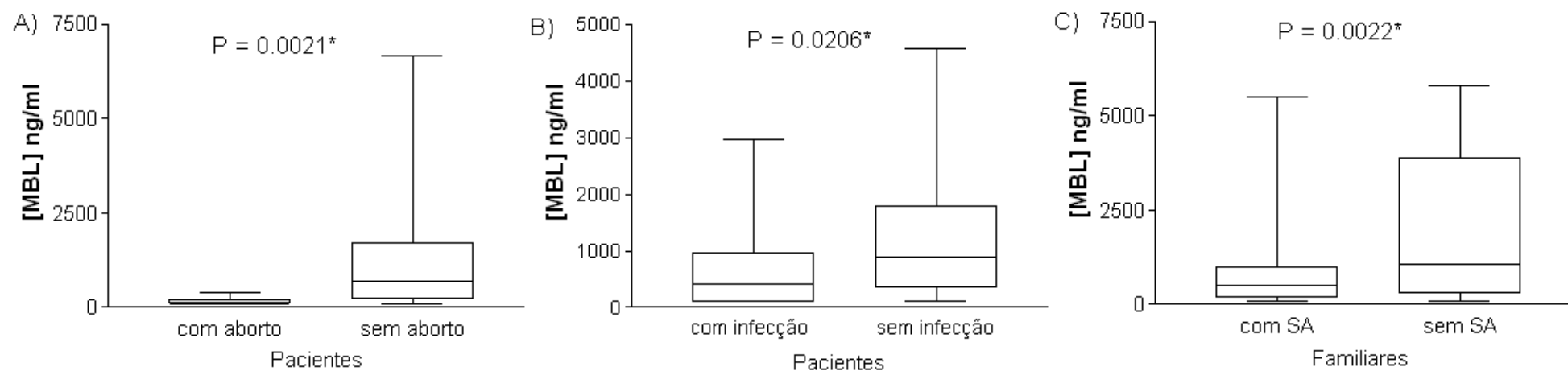


GRÁFICO 5 - CONCENTRAÇÕES DE MBL EM PACIENTES E FAMILIARES DE ACORDO COM CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

NOTA: \* = Teste não paramétrico de Mann-Whitney, SA = sintoma articular.

## 6.2 MASP-2

### 6.2.1 Frequências alélicas, haplotípicas e genotípicas

Tem-se na tabela 8 a frequência dos haplótipos de *MASP2* e suas respectivas nomenclaturas em pacientes, familiares e controles. Esses dados se encontram detalhados nos Apêndices 2, 5 e 8.

As frequências genotípicas de *MASP2* para cada locus e haplótipo inteiro não se desviam do modelo equilíbrio de Hardy-Weinberg nos grupos investigados, com exceção da distribuição haplotípica em familiares ( $P < 0,05$ ). Onze haplótipos de *MASP2* foram identificados em pacientes, familiares e controles: \*1A, \*1B1-*h*, \*1B2-*h*, \*1C1-*l*, \*1C2-*l*, \*2A1, \*2A2-*l*, \*2B1-*i*, \*2B2A-*i*, \*2B2B-*l*, \*2B2A-*i*.1B1-*h* (TABELA 11). Esse último é um haplótipo resultante da recombinação entre \*2B2A-*i* e \*1B1-*h* (FIGURA 15). As terminações *l*, *i* e *h* se referem à concentrações baixas, intermediárias e altas de MASP-2 (TABELA 8).

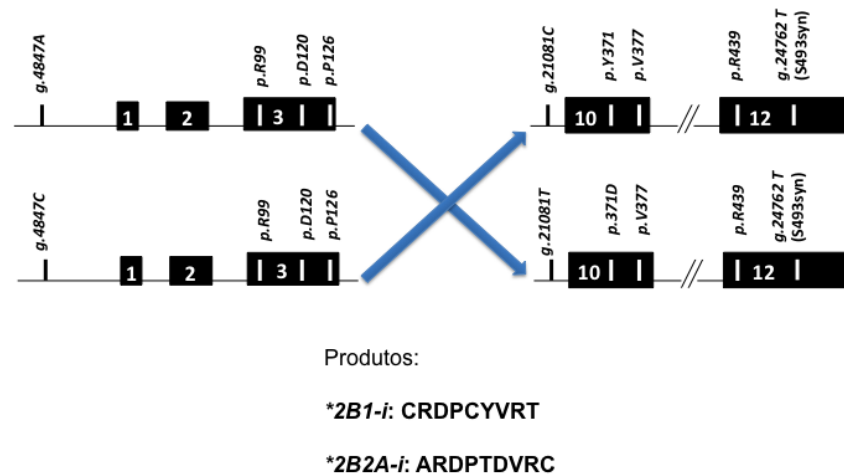


FIGURA 15 - RECOMBINAÇÃO ENTRE OS HAPLÓTIPOS \*2B2A-*i* e \*1B1-*h* DE *MASP2*

Os haplótipos *\*2A1* e *\*2B1-i* apresentaram associação com a AR (OR=6,0 [95%IC1,27-28,6] P=0,02; OR=2,2 [95%IC1,29-3,6] P=0,004, respectivamente; TABELA 8). A análise por regressão logística revelou que esses haplótipos estão associados com aumento em 3,32 vezes no risco para o desenvolvimento da doença (P=0,004, TABELA 9).

Corroborando esses achados, genótipos formados por *\*2A1* também foram mais frequentes em pacientes com AR (7/156, 4,5% vs. 2/230, 0,9%, OR=5,36 [95%IC1,10-26,14] P=0,03), assim como os genótipos com *\*2B1-i* (33/156, 21,2% vs. 25/230, 10,9%, OR=2,20 [95%IC1,25-3,87] P=0,009). Os genótipos formados por *\*1C1-I* e *\*2A2-I*, apresentaram associação com risco diminuído para AR (OR=0,25 [95%IC0,07-0,87] P=0,029; TABELA 9).

De forma similar aos pacientes com AR, familiares também apresentaram elevada frequência do haplótipo *\*2B1-i*, quando comparados aos controles (OR=2,02 [95%IC1,13-3,62] P=0,018; TABELA 8).

As demais análises dos haplótipos e genótipos nos grupos em estudo não evidenciaram diferenças significativas.

TABELA 8 – NOMENCLATURA DOS HAPLÓTIPOS DE *MAASP2* E RESPECTIVAS FREQUÊNCIAS (%) EM PACIENTES COM AR, FAMILIARES E CONTROLES

Haplótipos <sup>a</sup>	Sociedade de Variação do Genoma Humano <sup>b</sup>	Nomenclatura abreviada	Pacientes N=312	Familiares N=222	Controles N=460
*1A	[g.4847C; p.99R; p.120D; p.126P; g.21081C; p.371D; p.377V; p.439R; g.24762C]	CRDPCDVRC	4,8	6,3	5,2
*1B1-h	[g.4847C; p.99R; p.120D; p.126P; g.21081T; p.371D; p.377V; p.439R; g.24762C]	CRDPTDVRC	16,0	14,4	13,9
*1B2-h	[g.4847C; p.99Q; p.120D; p.126P; g.21081T; p.371D; p.377V; p.439R; g.24762C]	CQDPTDVRC	0,6	0	1,1
*1C1-l	[g.4847C; p.99R; p.120D; p.126L; g.21081C; p.371D; p.377V; p.439R; g.24762C]	CRDLCDVRC	0	0	1,3
*1C2-l	[g.4847C; p.99R; p.120D; p.126L; g.21081C; p.371D; p.377V; p.439H; g.24762C]	CRDLCDVHC	1,9	1,8	0,6
*2A1	[g.4847C; p.99R; p.120D; p.126P; g.21081C; p.371D; p.377V; p.439R; g.24762T]	CRDPCDVRT	<b>2,6<sup>c</sup></b>	1,4	0,4
*2A2-l	[g.4847C; p.99R; p.120D; p.126P; g.21081C; p.371D; p.377A; p.439R; g.24762T]	CRDPCDART	2,2	2,7	4,6
*2B1-i	[g.4847C; p.99R; p.120D; p.126P; g.21081C; p.371Y; p.377V; p.439R; g.24762T]	CRDPCYVRT	<b>11,5<sup>d</sup></b>	<b>10,8<sup>e</sup></b>	5,6
*2B2A-i	[g.4847A; p.99R; p.120D; p.126P; g.21081C; p.371Y; p.377V; p.439R; g.24762T]	ARDPCYVRT	59,0	59,9	65,4
*2B2B-l	[g.4847A; p.99R; p.120G; p.126P; g.21081C; p.371Y; p.377V; p.439R; g.24762T]	ARGPCYVRT	1,3	2,7	1,5
*2B2A-i. 1B1-h <sup>#</sup>	[g.4847A; p.99R; p.120D; p.126P; g.21081T; p.371D; p.377V; p.439R; g.24762C]	ARDPTDVRC	0	0	0,2

NOTA: N = número de cromossomos. # = haplótipo recombinante. a = nomenclatura filogenética de acordo com Boldt et al. (2011a), seguindo as regras sugeridas por Nebert (2002), onde as terminações “h”, “i” e “l” se referem aos haplótipos de *MAASP2* descritos como alto ( $\geq 600$  ng/ml), intermediário (200-600 ng/ml) e baixo (<200 ng/ml) produtores, b = Sequência referência, NT\_021937 (sequência do GenBank); c = pacientes vs. controles (OR=6,0 [95%IC1,27-28,6] P=0,02); d = pacientes vs. controles (OR=2,2 [95%IC1,29-3,6] P=0,004); e = familiares vs. controles (OR=2,02 [95%IC1,13-3,62] P=0,018).

TABELA 9 - REGRESSÃO LOGÍSTICA BINÁRIA PARA O RISCO DE ARTRITE REUMATÓIDE PACIENTES VS. CONTROLES

Pacientes vs. Controles (P<0,00001) N=256	Odds Ratio	95%IC	P
MASP-2 ( $\log_{10}$ )	0,05	0,02-0,13	< 0,0001
Genótipos com *1C1-I e/ou *2A2-I <sup>a</sup>	0,25	0,07-0,87	0,029
Genótipos com *2A1 e/ou *2B1-I <sup>b</sup>	3,32	1,48-7,45	0,004

NOTA: A significância do modelo é dada entre parênteses. Concentrações de MASP-2 foram normalizadas como logaritmos de base 10 ( $\log_{10}$ ). N = número de observações incluídas; a = associado com a proteína funcional e com concentrações baixas de MASP-2; b = associado com concentrações intermediárias de MASP-2.

### 6.2.2 Associação entre haplótipos de *MASP2* e características clínicas e sorológicas de pacientes com AR e familiares

Não houve associação entre os haplótipos de *MASP2* com a classe funcional, presença de nódulos reumatóides e síndrome de Sjögren, bem como com a positividade para anti-CCP e FR-IgM (TABELA 10).

De forma similar, não foi observada associação entre a positividade para o anti-CCP e FR-IgM e os haplótipos de *MASP2* nos familiares.

Por sua vez, observou-se por regressão logística que a presença das substituições de aminoácidos relacionadas à deficiência de MASP-2, *p.120G* e/ou *p.439H*, presentes nos haplótipos *\*2B2B-I* e *\*1C2-I* (TABELA 11), respectivamente, apresentaram associação com aumento de 5,13 vezes no risco para a presença de sintomas articulares entre os familiares de pacientes com AR, independentemente de idade, gênero, etnia, tabagismo e positividade para anti-CCP ou FR-IgM (familiares com e sem sintomas articulares, 5/50;10% vs. 5/172; 2,9%, respectivamente, OR=5,13 [95%IC1,26-20,84] P=0,02; TABELA 11).

De acordo com os resultados obtidos pela regressão logística, a positividade para anti-CCP aumentou em 6,45 vezes o risco de desenvolver AR nos familiares. Já a positividade para o FR-IgM aumentou este risco em 5,19 vezes (TABELA 11).

TABELA 10 - FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS DE *MASP2* (%) EM PACIENTES E FAMILIARES DE ACORDO COM CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Haplótipo <i>MASP2</i>	Familiares		Pacientes						
	anti-CCP+	FR-IgM +	anti-CCP+	FR-IgM +	Nódulos	Sjögren	Classe funcional		
	N=18	N=26	N=238	N=216	N=22	N=74	I N=150	II N=126	III+IV N=36
*1A	5,6	4,2	3,4	4,2	4,5	5,4	5,3	5,5	0
*1B1- <i>h</i>	11,1	4,2	16,4	16,2	18,2	13,5	16,7	15,9	2,4
*1B2- <i>h</i>	0	0	0,8	0,9	0	0	0,6	0,8	0
*1C1- <i>l</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
*1C2- <i>l</i>	5,6	4,2	2,5	1,8	0	1,4	2,0	2,4	0
*2A1	0	0	2,1	1,4	0	1,4	1,3	4,0	2,8
*2A2- <i>l</i>	0	0	2,9	2,3	9,1	4,0	1,3	2,4	5,5
*2B1- <i>i</i>	16,7	20,8	10,9	11,1	13,6	14,9	12,7	9,5	13,9
*2B2A- <i>i</i>	61,1	62,5	59,2	60,2	54,5	56,8	58,7	58,7	61,1
*2B2B- <i>l</i>	0	4,2	1,7	1,8	0	2,7	1,3	0,8	2,8

NOTA: anti-CCP = anticorpo antipeptídeo cíclico citrulinado; FR-IgM = fator reumatóide classe IgM, N = número de cromossomos; P = não significativo para todas as comparações.

TABELA 11 – REGRESSÃO LOGÍSTICA BINÁRIA PARA O RISCO DE ARTRITE REUMATÓIDE E SINTOMAS ARTICULARES EM FAMILIARES

Pacientes vs. Familiares (P<0,00001)	N=200	Odds Ratio	95%IC	P
MASP-2 (log <sub>10</sub> )		0,12	0,03-0,45	0,002
Anti-CCP positivo		6,45	2,38-17,45	< 0,0001
Fator reumatóide positivo		5,19	1,55-17,40	0,008
Idade		1,04	1,004-1,074	0,026
Familiares com SA vs. sem SA				
MASP-2 (log <sub>10</sub> ) (P=0,011)	N=44	0,06	0,004-0,73	0,03
Genótipos com *1C2-I e/ou *2B2B-I <sup>a</sup> (P=0,024)	N=111	5,13	1,26-20,84	0,02

NOTA: O modelo original incluía: idade, gênero e etnia para todas as observações; tabagismo, positividade para anti-CCP e fator reumatóide para pacientes e familiares. A significância do modelo é dada entre parênteses. Concentrações de MASP-2 foram normalizadas como logaritmos de base 10 (log<sub>10</sub>). SA = sintoma articular; anti-CCP = anticorpo antipeptídeo cíclico citrulinado; N = número de observações incluídas; <sup>a</sup> = associado com a deficiência de MASP-2.



### 6.2.3 Concentrações séricas de MASP-2 nos grupos em estudo

As concentrações séricas de MASP-2 variaram entre 21 ng/ml e 1200 ng/ml (IQR=199 ng/ml) nos pacientes, entre 30 ng/ml e 1646 ng/ml (329 ng/ml) nos familiares e entre 42 ng/ml e 1200 ng/ml (398 ng/ml) nos controles (APÊNDICES 1, 4 e 8).

As concentrações séricas de MASP-2 foram significativamente inferiores nos pacientes com AR em relação ao grupo controle (medianas 181 ng/ml e 340 ng/ml, respectivamente, Mann-Whitney,  $P<0,0001$ ), e aos familiares (medianas 285 ng/ml e 181 ng/ml, respectivamente, Mann-Whitney,  $P<0,0001$ ), porém sem diferença significativa nos familiares em relação aos controles (GRÁFICO 6).

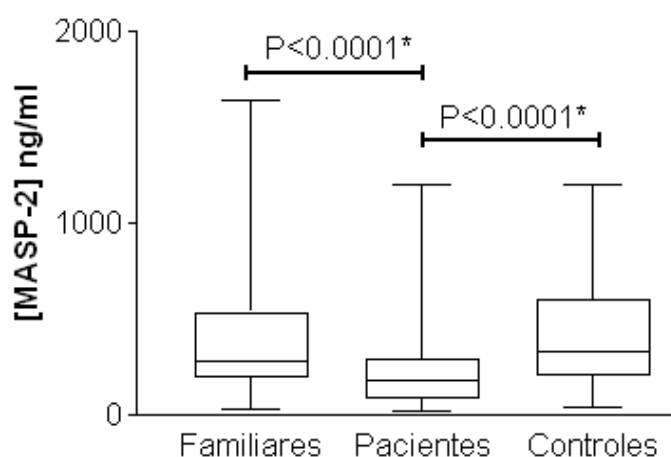


GRÁFICO 6 – CONCENTRAÇÕES DE MASP-2 NOS GRUPOS EM ESTUDO

NOTA: \* = Teste não paramétrico de Mann-Whitney; a distribuição das concentrações está representada em mediana e interquartis.

De fato, 56,4% (88/156) dos pacientes com AR apresentaram concentrações de MASP-2 inferiores a 200 ng/ml, superior ao encontrado nos demais grupos em estudo (22,7%, 10/44 familiares; 21,0%, 21/100 grupo controle; Chi-quadrado,  $P<0,0001$ , GRÁFICO 7).

Concentrações intermediárias de MASP-2 foram detectadas em 34,6% (54/156) pacientes, numa frequência inferior em relação aos familiares e controles (54,5%, 24/44 e 52,0%, 52/100, respectivamente, Chi-quadrado,  $P=0,0063$ ). Apenas 9,0% (14/156) dos pacientes apresentaram concentrações elevadas de MASP-2

( $\geq 600$  ng/ml), numa frequência inferior em relação aos familiares (22,7%, 10/44) e aos controles (27,0%, 27/100), (Chi-quadrado,  $P=0,0005$ , GRÁFICO 7).

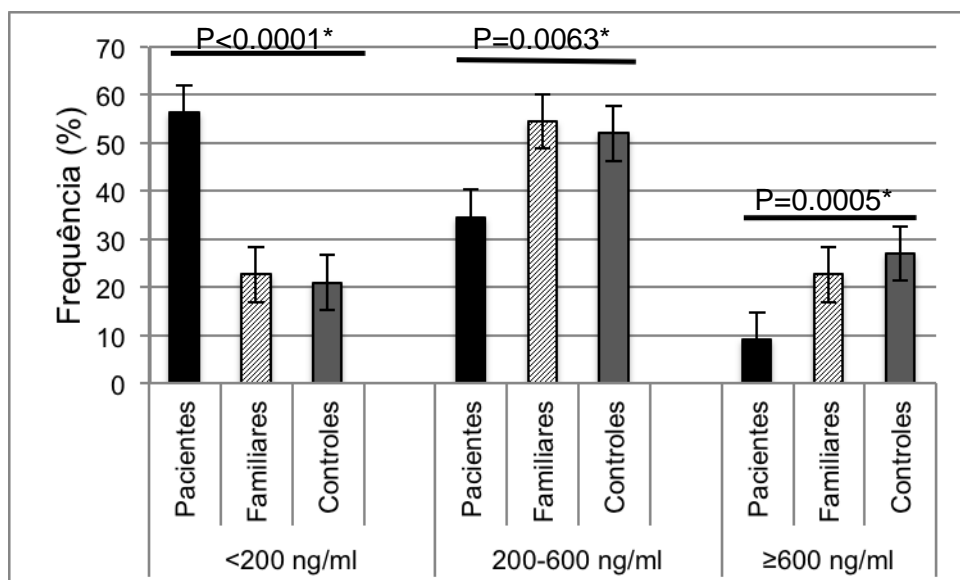


GRÁFICO 7 – GRUPOS EM ESTUDO DE ACORDO COM AS CONCENTRAÇÕES DE MASP-2

NOTA: concentrações altas =  $\geq 600$  ng/ml, intermediárias = 200-600 ng/ml e baixas =  $<200$  ng/ml; \* = Teste Chi-quadrado. Cut-offs foram definidos de acordo com Schlapbach et al. (2007).

No GRÁFICO 8 estão distribuídas as concentrações séricas de MASP-2 de acordo com o perfil de produção de cada genótipo para todos os grupos estudados. Como esperado, houve associação significativa entre as concentrações de MASP-2 e os haplótipos baixo, intermediário e alto produtores em todos os grupos investigados.

Independentemente do perfil produtor do genótipo apresentado, as medianas das concentrações séricas de MASP-2 em pacientes com AR foram sempre inferiores aos demais grupos em estudo. Houve sempre diferença significativa entre pacientes e controles, e pacientes e familiares, com exceção do grupo de familiares com haplótipos baixo produtores. Esses não apresentaram diferença significativa em relação aos pacientes com haplótipos baixo produtores (GRÁFICO 8).

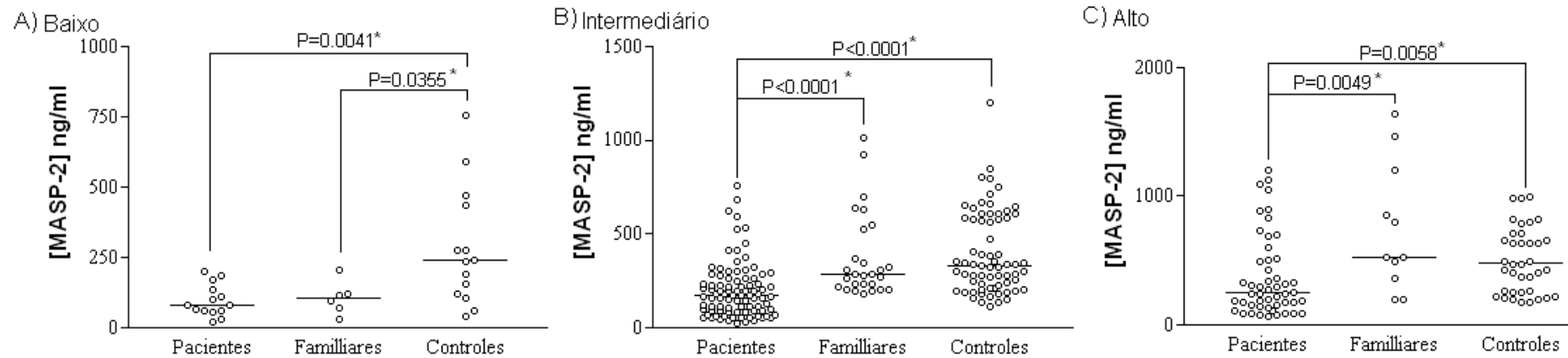


GRÁFICO 8 - GENÓTIPOS DE *MASP2* DISTRIBUÍDOS DE ACORDO COM O PERFIL DE PRODUÇÃO DA PROTEÍNA SÉRICA

NOTA: Os genótipos foram agrupados de acordo com o perfil de produção de MASP-2 (A = genótipos baixo produtores, B = genótipos médio produtores, C = genótipos alto produtores). Genótipos baixo produtores: *\*2B2B-I/\*1A*, *\*2B2A-i/\*2B2B-I*, *2B2B-I/2A1*, *\*2B2A-i/\*2A2-I*, *2B1-i/2A2-I*, *\*2B1-i/\*1C2-I*, *\*2B2A-i/\*1C2-I*, *\*1C2-I/1C2-I*, *\*2B2B-I/\*1C2-I*, *\*2A2-I/\*1C2-I*. Genótipos médio produtores: *\*2B2A-i/\*2B2A-i*, *\*2B2A-i/\*1A*, *\*2B2A-i/\*2B1-i*, *\*2B1-i/\*1A*, *\*2B1-i/2A1*, *\*2B1-i/\*2B1-i*. Genótipos alto produtores: *\*2B2A-i/\*1B1-h*, *\*2B2A-i/\*1B2-h*, *\*2B1-i/\*1B1-h*, *\*1B1-h/\*1B1-h*, *\*1A/\*1B1-h*, *\*2A1/1B1-h*, *\*2A1/\*2A1*, *\*2B2A-i/\*2A1*, *\*2A1/\*1A*, *\*2B2A-i.1B1-h/1B1-h*. \* Teste não paramétrico de Mann-Whitney; a distribuição das concentrações está representada em mediana.

#### 6.2.4 Associação entre concentrações de MASP-2 e características clínicas e sorológicas de pacientes com AR e familiares

Não houve associação entre as concentrações séricas de MASP-2 e a presença de síndrome de Sjögren, nódulos reumatóides, positividade para anti-CCP e FR-IgM, ou classe funcional nos pacientes com AR (TABELA 12).

Concomitantemente, concentrações elevadas de MASP-2 apresentaram efeito protetor contra AR mesmo após correção para idade, gênero e etnia ( $P < 0,0001$ ; TABELA 11).

A positividade para anti-CCP aumentou em 6,45 vezes o risco de familiares desenvolverem AR ( $P < 0,0001$ ). Já a positividade para o FR-IgM aumentou o risco para AR em 5,19 vezes no grupo de familiares (TABELA 11). Em contrapartida, concentrações altas de MASP-2 reduziram esse risco, independentemente de idade, gênero, etnia, tabagismo e positividade para anti-CCP e FR-IgM ( $OR = 0,12$  [95%IC 0,03-0,45]  $P = 0,01$ ; TABELA 11).

Sintomas articulares foram mais frequentes em familiares com concentrações baixas de MASP-2 (90,0%; 9/10) em comparação aos familiares com concentrações intermediárias/altas (13,3%; 4/34;  $P < 0,0001$ ; TABELA 12).

A mediana de MASP-2 sérica nos familiares com sintoma articular foi significativamente inferior a dos familiares sem esses sintomas (196 ng/ml vs. 315,5 ng/ml,  $P = 0,0143$ ), e do grupo controle (196 ng/ml vs 340 ng/ml,  $P = 0,0385$ ), porém sem diferença em relação aos pacientes. Já a mediana de familiares sem sintomas articulares foi significativamente maior em relação à mediana dos pacientes (315,5 ng/ml vs. 181 ng/ml,  $P < 0,0001$ , GRÁFICO 9).

TABELA 12 - CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE PACIENTES E FAMILIARES DE ACORDO COM AS CONCENTRAÇÕES DE MASP-2

		Anti-CCP+ <sup>a</sup>	FR-IgM+ <sup>b</sup>	Sjögren +	Nódulos	Classe funcional		Familiar
		% (N)	% (N)	% (N)	% (N)	I+II	III+IV	com SA
						% (N)	% (N)	% (N)
[MASP-2] ng/ml	Baixo	76,7 (66)	73,2 (63)	25,6 (22)	3,5 (3)	86,4 (76)	13,6 (12)	<b>90,0 (9)<sup>c</sup></b>
	Intermediário/ Alto	74,6 (53)	64,7 (46)	21,1 (15)	11,3 (8)	91,2 (62)	8,8 (6)	11,8 (4)

NOTA: a =  $\geq 20$  U/ml; b =  $\geq 30$  IU/ml; anti-CCP = anticorpo antipeptídeo cíclico citrulinado; SA = sintoma articular; Baixo =  $< 200$  ng/ml; Intermediário/Alto =  $\geq 200$  ng/ml; <sup>c</sup> = familiares com concentração baixa de MASP-2 e sintoma articular e vs. familiares com concentração intermediária/alta de MASP-2 e sintoma articular,  $P < 0,0001$ . Em negrito: diferenças significativas. Teste exato de Fisher.

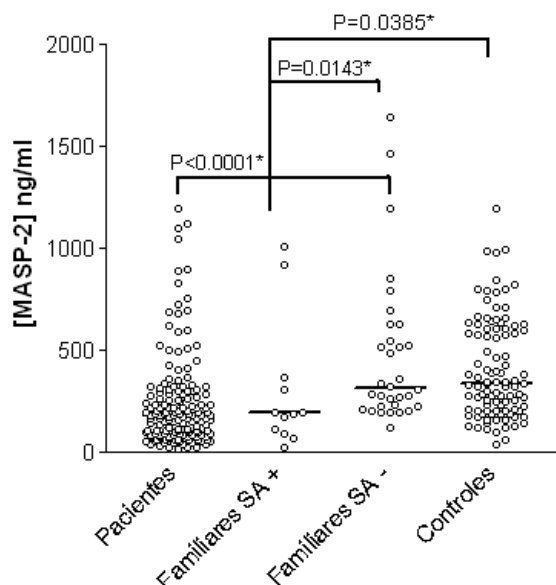


GRÁFICO 9 – CONCENTRAÇÕES DE MASP-2 EM FAMILIARES COM E SEM SINTOMA ARTICULAR EM RELAÇÃO AOS DEMAIS GRUPOS

NOTA: SA = sintoma articular; \* = Teste não paramétrico de Mann-Whitney; a distribuição das concentrações está representada em mediana.

Concentrações elevadas de MASP-2 diminuíram o risco de sintoma articular em familiares de pacientes com AR, independentemente de idade, gênero, grupo étnico, tabagismo e positividade para anti-CCP e FR-IgM (OR=0,06 [95%IC0,004-0,73]  $P=0,02$ ; TABELA 11). Em contrapartida, concentrações de anti-CCP e FR-IgM não tiveram efeito sobre o desenvolvimento de sintomas articulares sugestivos de AR em familiares ( $P=0,17$  e  $P=0,28$ , respectivamente), e não mostraram correlação com concentrações de MASP-2.

#### 6.2.5 Associação entre MBL e MASP-2

A análise por regressão logística incluindo MBL e MASP-2 simultaneamente confirmou o aumento no risco para AR relacionado ao haplótipo *LYPB* de *MBL2* (OR=2,43 [95%IC1,20-4,94]  $P=0,014$ ), assim como a relação observada entre o haplótipo *\*2B1-i* e o maior risco de desenvolvimento da AR (OR=12,3 [95%IC1,40-108,29]  $P=0,024$ ). De maneira semelhante, a relação entre concentrações altas de MASP-2 e a proteção em relação ao desenvolvimento da AR foi confirmada pela análise simultânea (OR=0,04 [95%IC0,013-0,12]  $P<0,0001$ ).

## 7 DISCUSSÃO

Sabe-se que a ativação do sistema complemento contribui significativamente para a patogênese da AR, e que fatores genéticos têm relação tanto com o desenvolvimento como com a evolução da doença (CHEN et al., 2010). Importantes associações entre polimorfismos gênicos de componentes do sistema imunológico e a AR já foram descritas (OKADA et al., 2012; VANDER CRUYSEN et al., 2007).

### 7.1 MBL

Graudal et al. (2000) descreveram a associação entre variantes do gene *MBL2* e o desenvolvimento precoce da AR, sugerindo que concentrações reduzidas da proteína poderiam acelerar o desenvolvimento da doença. Entretanto, o papel dos polimorfismos de *MBL2* na AR não está totalmente esclarecido (VAN DE GEIJN et al., 2008).

No presente estudo, pacientes com AR apresentaram concentrações séricas de MBL significativamente reduzidas em relação ao grupo controle, aumentando em 4.54 vezes o risco para AR ( $P < 0,0001$ ). Corroborando esse resultado, a variante *B* do gene *MBL2* inserida no haplótipo *LYPB*, relacionada à baixas concentrações séricas da proteína, apresentou prevalência aumentada nos pacientes com AR em relação aos controles, aumentando em 3,10 vezes o risco para AR ( $P = 0,001$ ). O presente achado está de acordo com estudos que relatam aumento da variante *B* de *MBL2* em pacientes com AR (IP et al., 2000; TSUTSUMI et al., 2001; XIE et al., 2012). Estudando os polimorfismos e concentrações séricas de MBL na população do sul da China, Ip et al. (2000) encontraram concentrações reduzidas de MBL em pacientes com AR independentemente da presença da variante *B* *MBL2*, apesar da mesma ter sido mais frequente em pacientes com AR. Assim, outros fatores podem influenciar as concentrações séricas de MBL, tais como variantes gênicas desconhecidas e as interleucinas IL1 e TNF- $\alpha$ , cuja influência sobre a síntese de MBL já foi sugerida (TAYLOR et al., 1989).

Familiares de pacientes com AR apresentaram concentrações de MBL aumentadas em relação aos pacientes ( $P = 0,0071$ ), contrariando os dados de

Saevarsdottir et al. (2007) na população islandesa, o que pode refletir diferenças genéticas e ambientais entre as populações estudadas. Esse achado aponta para um papel protetor das concentrações altas de MBL em relação ao desenvolvimento da AR. Entretanto, estudos envolvendo grupos maiores de indivíduos são necessários para confirmar tal constatação.

Algumas hipóteses sugerem origem infecciosa para o desenvolvimento da AR. Diversos autores demonstraram associação entre o desenvolvimento da AR e a periodontite causada pela bactéria *Porphyromonas gingivalis* (QUIRKE et al., 2013). Essa bactéria possui na composição de sua parede celular diversos açúcares ligantes de MBL (ZEITUNI et al., 2010). Dessa forma, a presença de concentrações reduzidas de MBL, comprometendo a opsonização e ativação do SC, poderiam favorecer a ocorrência de infecções por micro-organismos relacionados ao desenvolvimento da AR, tais como *P. gingivalis*. Em contrapartida, Maffei et al., 2005, estudando um pequeno grupo de pacientes com periodontite não encontrou relação entre concentrações reduzidas de MBL e maior suscetibilidade à periodontite causada por *P. gingivalis*. Entretanto, deve-se levar em conta que alterações imunológicas peculiares da doença podem alterar o papel das concentrações de MBL na AR e nas infecções concomitantes à mesma. Corroborando essa hipótese, no presente estudo, foi comprovada associação entre concentrações baixas de MBL e ocorrência de infecções de repetição ( $P=0,0206$ ) (SUPER et al., 1989).

Concomitantemente, foi observada associação entre a história de abortos espontâneos e concentrações baixas de MBL ( $P=0,0021$ ), o que está de acordo com a literatura (KILPATRICK, 2002). A ausência de estudos na literatura relatando maior frequência de abortos em pacientes com AR reforça a hipótese de que as concentrações de MBL, e não a doença em si, estejam influenciando o curso da gravidez em pacientes com AR (CLOWSE et al., 2012).

Tendo em vista o importante papel da MBL na remoção de células apoptóticas e imunocomplexos, é possível supor que, diante da diminuição nas concentrações séricas da proteína, ocorra falha na eliminação de constituintes próprios do organismo, estando os mesmos sujeitos à apresentação antigênica. Assim, a estimulação indevida do sistema imunológico a partir da apresentação de um antígeno próprio poderia culminar com o desenvolvimento de resposta autoimune, como ocorre na AR. Além disso, a MBL parece participar na eliminação



de complexos imunes contendo agalactosil-IgG, provavelmente contribuindo de maneira positiva para a prevenção do quadro inflamatório inicial na AR (GARRED et al., 2000).

Além disso, a presença do haplótipo *LXPA*, relacionado a baixas concentrações de MBL ( $P=0,036$ ), apresentou associação com anti-CCP nos pacientes. A positividade para esse autoanticorpo tem sido reconhecida como marcador de pior prognóstico para a AR, sendo necessária uma abordagem terapêutica mais agressiva para pacientes anti-CCP positivos (WILLEMZE et al., 2012). A terapia para a AR frequentemente se baseia na imunossupressão do paciente, tendo como consequência graves efeitos colaterais (ISAACS, 2010). Levando-se em consideração que a deficiência de MBL está associada ao aumento de infecções, o tratamento de pacientes com AR anti-CCP positivos deveria ser avaliado juntamente com a concentração de MBL dos pacientes, com o intuito de reduzir o risco de infecções oportunistas.

Variantes do gene *MBL2* relacionadas à baixa produção da proteína já foram previamente associadas à presença de nódulos reumatóides em pacientes brasileiros com AR, indicando uma relação entre concentrações baixas da proteína e pior prognóstico da doença também na população brasileira (MARTINY et al., 2012). Neste contexto, Ip et al. (2000), Jacobsen et al. (2001) e Saevarsdottir et al. (2001), de maneira independente, demonstraram associação entre concentrações diminuídas de MBL e pior prognóstico para AR.

No presente estudo, o alelo O do exon 1 aumentou o risco para o desenvolvimento da AR ( $P=0,026$ ). Entretanto, não foi observada associação entre esse alelo e a presença de nódulos reumatóides, provavelmente devido ao baixo número de pacientes com essa característica na amostra estudada.

Também não foi observada associação entre nódulos reumatóides, síndrome de Sjögren secundária e classe funcional, com concentrações baixas de MBL ou variantes de *MBL2* relacionadas à baixa produção da proteína. Esta falta de associação pode decorrer do fato de que os pacientes com AR participantes da pesquisa apresentavam AR já estabelecida (mediana do tempo de duração da doença igual a 6 anos), e tais associações são observadas com maior clareza em grupos de pacientes com AR inicial (GRAUDAL et al., 2002). Além disso, a ausência de dados relacionados à presença de erosão óssea, bem como o pequeno número

de pacientes com manifestações extra-articulares graves, provavelmente limitaram a descoberta de tais associações no presente estudo.

Segundo Jacobsen et al., (2001) e Ip et al., (2000), a presença de genótipos baixo produtores de MBL está relacionada ao maior risco de desenvolvimento de erosão óssea. Dessa forma, pacientes com AR recente e portadores de variantes relacionadas à baixas concentrações de MBL devem ser acompanhados com especial atenção pelo clínico.

A ausência de associação entre as variantes gênicas de *MBL2*, assim como entre as concentrações de MBL, e a classe funcional dos pacientes com AR possivelmente se deve ao fato de que essa classificação é fortemente influenciada pelas atitudes dos pacientes para proteger as articulações contra deformidades e pela facilidade de acesso ao atendimento médico e ao tratamento adequado. Assim, o nível socioeconômico do paciente pode "mascarar" a associação entre classe funcional e fatores genéticos e sorológicos.

Tanto os pacientes com AR, como familiares com sintomas articulares apresentaram elevada prevalência de variantes de *MBL2* associadas à concentrações reduzidas de MBL ( $P=0,038$  e  $P<0,0001$ , respectivamente). Considerando-se que familiares de pacientes com AR constituem um grupo de risco para o desenvolvimento da doença (MICHOU et al., 2008; GOELDNER et al., 2010), e que concentrações reduzidas de MBL podem estar relacionadas ao desenvolvimento acelerado da mesma (GRAUDAL et al., 2000), o presente achado permite sugerir que familiares portadores de variantes relacionadas à concentrações baixas de MBL podem estar suscetíveis ao desenvolvimento da AR de maneira precoce e com evolução mais rápida em relação aos não portadores dessa variante.

Corroborando este achado, familiares com sintomas articulares apresentaram concentrações significativamente reduzidas de MBL em relação aos familiares sem esse tipo de sintoma ( $P=0,0022$ ). Em estudo recente, Smolik et al. (2013) observaram elevada prevalência de sintomas articulares em familiares de pacientes com AR. Entretanto, essa característica parece estar apenas parcialmente relacionada à elevada positividade para autoanticorpos, concomitantemente encontrada nesses indivíduos. Neste contexto, embora não se tenha encontrado associação entre as concentrações de MBL e a positividade para anti-CCP e FR-IgM em familiares, é possível sugerir que concentrações baixas de MBL também

contribuam para o desenvolvimento de sintomas articulares sugestivos de AR em familiares de pacientes.

Dolman et al. (2008) relataram associação entre a deficiência de MBL e o início precoce da artrite idiopática juvenil em pacientes noruegueses. Porém, os autores também relatam que concentrações baixas de MBL parecem favorecer a remissão da doença nesses pacientes, o que aponta para um papel duplo da MBL na doença reumática.

## 7.2 MASP-2

O papel das proteínas do sistema complemento no desenvolvimento da AR e sua progressão clínica é foco de investigações há tempos, porém vários aspectos dessa relação ainda permanecem pouco esclarecidos (VANDER CRUYSEN et al., 2007; GRAUDAL et al., 2000). Além dos estudos envolvendo MBL, diversas outras proteínas do SC já foram investigadas, e algumas revelaram intrigante associação com a AR (KATSCHKE et al., 2007; VANDER CRUYSEN et al., 2007; BANDA et al., 2010; AMMITZBOLL et al., 2012).

O presente estudo é pioneiro ao sugerir associação entre as concentrações séricas de MASP-2 e polimorfismos do gene *MASP2*, e o risco para o desenvolvimento da AR em pacientes brasileiros e familiares.

Pacientes com AR apresentaram concentrações significativamente reduzidas de MASP-2 em relação aos familiares e controles ( $P < 0,001$ ), sendo essa redução não associada à presença de variantes gênicas de *MASP2* associadas à baixa produção da proteína. Por sua vez, familiares de pacientes com AR apresentaram concentrações de MASP-2 tão elevadas quanto o grupo controle, o que sugere um papel protetor das concentrações altas de MASP-2 para o desenvolvimento da AR.

De fato, foi observado que concentrações elevadas de MASP-2 diminuíram significativamente o risco para o desenvolvimento de AR entre os familiares de pacientes ( $P = 0,002$ ), contrastando com o aumento em 6,45 vezes no risco para AR conferido pela positividade para o anti-CCP ( $P < 0,0001$ ). Cabe ressaltar que o efeito protetor relacionado às concentrações elevadas de MASP-2 foi observado independentemente dos marcadores FR-IgM e anti-CCP.

Corroborando esses achados, familiares com sintomas articulares apresentaram concentrações de MASP-2 tão reduzidas quanto os pacientes com AR, sendo que concentrações elevadas da proteína reduziram o risco de sintoma articular nos familiares ( $P=0,03$ ). Curiosamente, FR-IgM e anti-CCP não apresentaram associação com a presença de sintomas articulares em familiares de pacientes com AR. Entretanto, deve-se levar em conta que mesmo na AR já estabelecida, cerca de 20% dos pacientes permanecem soronegativos.

A falta de associação de marcadores como anti-CCP pode refletir as diferenças já descritas entre a AR na presença ou ausência de positividade para o anti-CCP, sendo que alguns autores sugerem a existência de duas doenças diferentes de acordo com a positividade para esse autoanticorpo (WILLEMZE et al., 2012).

A redução das concentrações de MASP-2 observada no presente estudo pode ser atribuída ao consumo da proteína, o que já foi descrito para outras doenças que envolvem processos inflamatórios acentuados (ZHANG et al., 2013; FRAUENKNECHT et al., 2013). Concomitantemente, a expressão de produtos do processamento alternativo do gene *MASP2* pode estar aumentada, em detrimento da expressão de MASP-2. Corroborando essa hipótese, BOLDT et al. (2011a) descreveram uma associação negativa entre as concentrações de MASP-2 e de MAP19, provavelmente devido ao impacto de SNPs em regiões estratégicas para a ligação do spliceossomo.

A proteína MAP19 parece atuar na regulação da ativação do SC, sendo assim, é possível que o aumento da sua expressão em detrimento de MASP-2 seja uma tentativa do sistema imunológico de frear o processo inflamatório em curso e restabelecer a homeostase do organismo (DEGN et al., 2011).

Estudos têm sugerido a modulação da expressão de *MASP2* por citocinas como IL1b, IL6 e a proteína ligante STAT3. Enquanto a IL1b parece estimular a expressão gênica de *MASP2*, a presença de IL6 causa repressão da mesma (ENDO et al., 2002). A produção de IL6 pela membrana sinovial inflamada é acentuada em pacientes com AR, o que poderia estar relacionado às concentrações diminuídas de MASP-2 nos pacientes com AR (MOELANTS et al., 2013). Por sua vez, a ligação de STAT3 ao seu sítio no promotor de *MASP2* permite que a atividade de transcrição

ocorra normalmente, sendo que mutações nesse sítio diminuem em até cinco vezes a taxa de transcrição de *MASP2* (UNTERBERGER et al., 2007).

Em contrapartida, o aumento na permeabilidade da membrana sinovial de pacientes com AR foi relacionado à difusão de proteínas séricas para o líquido sinovial e seu consumo no interior desse compartimento, o que também poderia contribuir para a diminuição das concentrações séricas de proteínas como MASP-2 e MBL (SWAAK et al., 1987).

Já foi descrita a influência de hormônios como da tireoide e do crescimento na expressão de algumas proteínas do SC, incluindo MBL (SORENSEN et al., 2006; THIEL et al., 2012). Dessa forma, fatores hormonais poderiam estar contribuindo para a redução das concentrações séricas de MBL e MASP-2, em conjunto com as variantes gênicas desses genes. Entretanto, mais estudos são necessários a fim de esclarecer essa relação.

Estudos recentes demonstram ainda o consumo tanto de MASP-2, como de MBL, em processos homeostáticos relacionados à eliminação de mitocôndrias na ausência de inflamação (BRINKMANN et al., 2013). É possível que concentrações reduzidas de MBL e MASP-2 possam refletir o consumo dessas proteínas na eliminação de mitocôndrias hepáticas em decorrência do tratamento frequentemente hepatotóxico (SALLIOT, VAN DER HEIJDE, 2009).

No presente estudo, caracterizou-se elevada frequência dos haplótipos de *MASP2*, *\*2A1* e *\*2B1-i*, em pacientes com AR ( $P=0,02$  e  $P=0,004$ , respectivamente). Por sua vez, o haplótipo *\*2B1-i* apresentou frequência elevada nos familiares de pacientes com AR em relação aos controles ( $P=0,018$ ). Esses haplótipos relacionados à concentrações intermediárias da proteína aumentaram em três vezes o risco para o desenvolvimento da AR. Entretanto, outros haplótipos também relacionados à concentrações intermediárias da doença não apresentaram a mesma relação. É possível que a associação observada nesse estudo se deva ao desequilíbrio de ligação entre alguma variante desses haplótipos.

As variantes associadas à deficiência de MASP-2, *p.120G* e *p.439H* (haplótipos *\*2B2B-I* e *\*1C2-I*, respectivamente) apresentaram associação com a presença de sintomas articulares em familiares de pacientes com AR ( $P=0,02$ ). Essas variações no gene *MASP2* tornam a proteína MASP-2 incapaz de ativar o sistema complemento (BOLDT et al., 2012). Este achado está de acordo com outros

estudos que relatam a importância de deficiências do SC na imunopatologia da AR (IP et al., 2000; TROELSEN et al., 2010).

É possível que variantes ainda desconhecidas dos genes *MBL2* e *MASP2* estejam influenciando a expressão de MASP-2 e MBL, e possam estar associadas aos resultados obtidos no presente estudo. Além disso, alterações epigenéticas, tais como metilação de DNA e modificações pós traducionais, são fundamentais na regulação gênica e seu papel na AR permanece ainda por ser esclarecido (VIATTE et al., 2013).

Tendo em vista que as análises realizadas no presente estudo foram corrigidas em relação à etnia, é pouco provável que diferenças étnicas entre os grupos analisados estejam influenciando os resultados observados.

Deve-se considerar ainda a possível influência do tratamento sobre as concentrações séricas das proteínas do SC. Tendo em vista a influência da citocina TNF- $\alpha$  sobre a síntese de MBL, a terapia com drogas anti-TNF- $\alpha$  poderia contribuir para as baixas concentrações de MBL, e talvez MASP-2, observadas no presente estudo. Por sua vez, o uso de corticoesteróides parece não influenciar tais concentrações (SORENSEN et al., 2006). É possível ainda supor que o escore de atividade da doença poderia contribuir para as variações protéicas observadas nesse estudo. Entretanto, devido ao caráter momentâneo do DAS 28, além da influência do tratamento sobre o mesmo, optou-se por não considerar esse dado na interpretação dos resultados do presente estudo afim de evitar interpretações errôneas.

A modulação das concentrações séricas das proteínas do SC é multifatorial. Tanto fatores ambientais, como o tabagismo e a exposição a diferentes antígenos, quanto alterações genéticas podem influenciar a expressão dessas proteínas, que estão diretamente relacionadas à resposta inflamatória. Entretanto, variações relacionadas à resposta inflamatória de fase aguda parecem não interferir de maneira significativa nas concentrações séricas de MBL e MASP-2 (HOLMSKOV, THIEL, JENSENIUS, 2003; THIEL et al., 2012).

O presente estudo é pioneiro na determinação concomitante das concentrações séricas de MASP-2 e MBL, e dos polimorfismos de *MASP2* e *MBL2* em pacientes com AR e seus familiares. Os resultados permitem sugerir relevante associação entre concentrações reduzidas de MASP-2 e MBL, assim como

genótipos relacionados a baixas concentrações de MBL e o risco de desenvolvimento da AR. Sugere-se ainda, que proteínas do SC sejam avaliadas em pacientes com AR, especialmente naqueles submetidos à terapia mais agressiva, visando contribuir para maior segurança do tratamento. Adicionalmente, acredita-se que familiares de pacientes com AR possam ser beneficiados pelo esclarecimento do papel das proteínas do SC no risco para o desenvolvimento da AR, possibilitando o diagnóstico precoce da doença. Nesse contexto, novas pesquisas envolvendo esse grupo populacional são necessárias para responder ao grande número de perguntas ainda a esclarecer.

## 8 CONCLUSÕES

A análise dos dados do presente estudo levou às seguintes conclusões:

- Concentrações séricas baixas de MBL e MASP-2, assim como variantes relacionadas à baixa produção de MBL estão associadas ao risco elevado para o desenvolvimento da AR em nosso meio;
- Baixas concentrações séricas de MBL se mostraram associadas à maior frequência de abortos e infecções em pacientes com AR;
- As concentrações séricas de MBL e MASP-2 e seus genótipos não influenciam na positividade para os autoanticorpos anti-CCP e FR-IgM, classe funcional e presença de nódulos reumatóides em pacientes com AR;
- Os haplótipos *\*2A1* e *\*2B1-i* de *MASP2*, estão associados com maior risco para o desenvolvimento da AR;
- Concentrações elevadas de MASP-2 estão associadas à proteção tanto para a presença de sintoma articular como para o desenvolvimento de AR em familiares de pacientes;
- As variantes de *MASP2*, *p.120G* (haplótipo *\*2B2B-I*) e *p.493H* (haplótipo *\*1C2-I*), relacionadas à deficiência na ativação do sistema complemento, aumentam o risco de sintoma articular em familiares de pacientes;
- Os resultados obtidos permitem sugerir que a genotipagem dos polimorfismos de *MBL2* e *MASP2*, bem como as concentrações séricas de MBL e MASP-2 podem representar futuras ferramentas como biomarcadores para a AR.



## REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Cellular and molecular Immunology**. EUA: Sauders Elsevier Inc., Ed.7, 2012.
- ABDEL-NASSER, A.M.; RASKER, J.J.; VALKENBURG, H.A. Epidemiological and clinical aspects relating to the variability of rheumatoid arthritis. **Semin arthritis rheum.**, v.27, n.2, p.123-40, 1997.
- AGBANOMA, G. et al. Production of TNF- $\alpha$  in macrophages activated by t cells, compared with lipopolysaccharide, uses distinct il-10-dependent regulatory mechanism. **J Immunol.**, v.188, n.3, p.1307-17, 2012.
- AGHAMOHAMMADI, A. et al. Mannose-binding lectin polymorphisms in common variable immunodeficiency. **Clin Exp Med.**, v.9, n.4, p.285-90, 2009.
- ALAMANOS, Y.; VOULGARI, P.V.; DROSOS, A.A. Incidence and prevalence of rheumatoid arthritis, based on the 1987 American College of Rheumatology criteria: a systematic review. **Semin Arthritis Rheum.**, v.36, p.182-188, 2006.
- ALEMANY-RODRÍGUEZ, M.J. et al. [Autoimmune diseases and multiple sclerosis]. **Rev Neurol.**, v.40, n.10, p.594-7, 2005.
- ALETAHA, D. et al. 2010 Rheumatoid Arthritis Classification Criteria. **Arthritis Rheum.**, v.62, n.9, p.2569-81, 2010.
- AMMITZBOLL, C.G. et al. Levels of lectin pathway proteins in plasma and synovial fluid of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. **Rheumatol Int.**, v.32, p.1457-63, 2012.
- ANDERSON, J. et al. Rheumatoid arthritis disease activity measures: american college of rheumatology recommendations for use in clinical practice. **Arthritis Care Res.**, v.64, p.640-7, 2012.
- AREND, W.P. et al. Roles of adipocytes and fibroblasts in activation of the alternative pathway of complement in inflammatory arthritis in mice. **J Immunol.**, v.90, n.12, p.6423-33, 2013.
- ARNETT, F.C. et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.**, v.31, p.315-24, 1988.
- ARROYO-VILLA, I. et al. Frequency of Th17 CD4+ T Cells in Early Rheumatoid Arthritis: A Marker of Anti-CCP Seropositivity. **PLoS ONE**, v.7, p.1-8, 2012.
- ASTORGA, G. P., WILLIAMS, R. C. J. Altered reactivity in mixed lymphocyte culture of lymphocytes from patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.**, v.12, p.547-554, 1969.

BALI, D. et al. Genetic analysis of multiplex rheumatoid arthritis families. **Genes Immun.**, v.1, p.28-36, 1999.

BALLANTI, E. et al. Complement and autoimmunity. **Immunol Res.**, v.56, n.2-3, p.477-91, 2013.

BANDA, N.K. et al. Essential role of complement mannose-binding lectin-associated serine proteases-1/3 in the murine collagen antibody-induced model of inflammatory arthritis. **J Immunol.**, v.185, n.9, p.5598-606, 2010.

BERGSTRÖM, U. et al. Pulmonary dysfunction, smoking, socioeconomic status and the risk of developing rheumatoid arthritis. **Rheumatology (Oxford)**., v.50, n.11, p. 2005-13, 2011.

BOLDT, A.B.; PETZL-ERLER, M.L. A new strategy for mannose-binding lectin gene haplotyping. **Hum Mutat.**, v.19, n.3, p.296-306, 2002.

BOLDT, A.B. et al. Diversity of the MBL2 gene in various Brazilian populations and the case of selection at the mannose-binding lectin locus. **Hum Immunol.**, v.67, n.9, p.722-34. 2006.

BOLDT, A.B. et al. Phylogenetic nomenclature and evolution of mannose-binding lectin (MBL2) haplotypes. **BMC Genet.**, v.11, p.38, 2010.

BOLDT, A.B. et al. Multiplex sequence-specific polymerase chain reaction reveals new MASP2 haplotypes associated with MASP-2 and MASP19 serum levels. **Hum Immunol.**, v.72, n.9, p.753-60, 2011a.

BOLDT, A.B.; LUZ, P.R.; MESSIAS-REASON, I.J. MASP2 haplotypes are associated with high risk of cardiomyopathy in chronic Chagas disease. **Clin Immunol.**, v.140, n.1, p.63-70, 2011b.

BOLDT, A.B.; GOELDNER, I.; MESSIAS-REASON, I.J.T. Relevance of the lectin pathway of complement in rheumatic diseases. In: MAKOWSKI, G.S. **Adv Clin Chem.** 1 ed. Amsterdam: Elsevier Inc., 2012, 105-37.

BOLDT, A.B. et al. Leprosy Association with Low MASP-2 Levels Generated by MASP2 Haplotypes and Polymorphisms Flanking MASP19 Exon 5. **PLoS One**, v.8, n.7, p.e69054, 2013.

BONIOTTO, M. et al. Evidence of a correlation between mannose binding lectin and celiac disease: a model for other autoimmune diseases. **J Mol Med.**, v.83, n.4, p.308-15, 2005.

BOUMANS, M.J. et al. Response to rituximab in patients with rheumatoid arthritis in different compartments of the immune system. **Arthritis Rheum.**, v.63, p.3187-94, 2011.

BRATS. Medicamentos Biológicos para o Tratamento da Artrite Reumatóide. **Boletim Brasileiro de Avaliação de Tecnologias em Saúde**. n.19, 2012.

BRINKMANN, C.R. et al. Mitochondria and the lectin pathway of complement. **J Biol Chem.**, v.288, n.12, p.8016-27, 2013.

BROUWER, M.C. et al. Genetic variation and cerebrospinal fluid levels of mannose binding lectin in pneumococcal meningitis patients. **PLoS One.**, v.8, n.5, :e65151. doi: 10.1371, 2013.

BROWN, M.A.; NEWTON, J.L.; WORDSWORTH, B.P. Genetics for Rheumatologists - The molecular genetic basis of rheumatological disorders. **Remedica, Londres**, 2002.

CARROLL, M.V.; SIM, R.B. Complement in health and disease. **Adv Drug Delivery Rev.**, v.63, p.965–75, 2011.

CARVALHO, E.G. et al. Serum mannan-binding lectin levels in patients with celiac disease: an analysis of clinical and autoimmune features. **Dig Dis Sci.**, v.52, n.9, p.2145-51, 2007.

CHAKA, W. et al. Induction of TNF-alpha in human peripheral blood mononuclear cells by the mannoprotein of *Cryptococcus neoformans* involves human mannose binding protein. **J Immunol.**, v.159, n.6, p.2979-85, 1997.

CHALMERS, J.D. et al. Impact of mannose-binding lectin insufficiency on the course of cystic fibrosis: A review and meta-analysis. **Glycobiology.**, v.21, n.3, p.271-82, 2011.

CHATFIELD, S.M. et al. Anti-citrullinated peptide antibody: death of the rheumatoid factor? **MJA**, v.190, p.693-5, 2009.

CHEN, M.; DAHA, M.R.; KALLENBERG, C.G. The complement system in systemic autoimmune disease. **J Autoimmun.**, v.34, n.3, p.J276-86, 2010.

CHEN, C.B.; WALLIS, R. Stoichiometry of complexes between mannose-binding protein and its associated serine proteases. Defining functional units for complement activation. **J Biol Chem.**, v.276,p. 25894-902, 2001.

CHO, I.; BLASER, M.J. The human microbiome: at the interface of health and disease. **Nat Rev Genet.**, v.13, p.260-70, 2012.

CLOWSE, M.E. et al. Effects of infertility, pregnancy loss, and patient concerns on family size of women with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. **Arthritis Care Res (Hoboken).**, v.64, n.5, p.668-74, 2012.

DAHL, M.R. et al. MASP-3 and its association with distinct complexes of the mannan-binding lectin complement activation pathway. **Immunity**, v.15, p.127-35, 2001.

DAVIES, E.J. et al. A dysfunctional allele of the mannose binding protein gene associates with systemic lupus erythematosus in a Spanish population. **J Rheumatol.**, v.24, n.3, p.485-8, 1997.

DELGADO-VEGA, A.M.; ANAYA, J.M. Meta-analysis of HLA-DRB1 polymorphisms in Latin American patients with rheumatoid arthritis. **Autoimmun Rev.**, v.6, n.6, p.402-8, 2007.

DEGN, S.E. et al. MAP19, the alternative splice product of the *MASP2* gene. **J Immunol Met.**, v.373, p.89-101, 2011.

DEGN, S.E. et al. Mannan-Binding Lectin-Associated Serine Protease (MASP)-1 Is Crucial for Lectin Pathway Activation in Human Serum, whereas neither MASP-1 nor MASP-3 Is Required for Alternative Pathway Function. **J Immunol.**, v.189, p.3957-69, 2012.

DEL RINCÓN, I.D. et al. High incidence of cardiovascular events in a rheumatoid arthritis cohort not explained by traditional cardiac risk factors. **Arthritis Rheum.**, v.44, n.12, p.2737-45, 2001.

DEMORUELLE, M.K. et al. Anti-cyclic citrullinated peptide assays differ in subjects at elevated risk for rheumatoid arthritis and subjects with established disease. **Arthritis Rheum.**, 2013 May 17. doi: 10.1002/art.38017. [Epub ahead of print]

DENNISON, E.M.; COOPER, C. Corticosteroids in rheumatoid arthritis. **BMJ**, v.316, p.789-90, 1998.

DOLMAN, K.M. et al. Mannose-binding lectin deficiency is associated with early onset of polyarticular juvenile rheumatoid arthritis: a cohort study. **Arthritis Res Ther.**, v.10, p.R32, 2008.

DOMMETT, R.M., KLEIN, N., TURNER, M.W. Mannose-binding lectin in innate immunity: past, present and future. **Tissue Antigens**, v.68, n.3, p.193-209, 2006.

DORNELLES, L.N., PEREIRA-FERRARI, L.; MESSIAS-REASON, I. Mannan-binding lectin plasma levels in leprosy: deficiency confers protection against the lepromatous but not the tuberculoid forms. **Clin Exp Immunol**, v.145, n.3, p.463-8, 2006.

DURIGUTTO, P. et al. Prevention of arthritis by locally synthesized recombinant antibody neutralizing complement component C5. **PLoS One**, v.8, n.3, p.e58696, 2013.

ENDO, M. et al. Complement activation through the lectin pathway in patients with Henoch-Schonlein purpura nephritis. **Am J Kidney Dis.**, v.35, n.3, p.401-407, 2000.

ENDO, Y. et al. Functional characterization of human mannose-binding lectin-associated serine protease (MASP)-1/3 and MASP-2 promoters, and comparison with the C1s promoter. **Int Immunol.**, v.14, p.1193-201, 2002.

EZERKOWITZ, R.A. Genetic heterogeneity of mannose-binding proteins: the Jekyll and Hyde of innate immunity? **Am J Hum Genet.**, v. 62, p. 6-9, 1998.

FARHAT, S.C.L. et al. Air pollution in autoimmune rheumatic diseases: A review. **Autoimmun Rev.**, v.11, n.1, p.14-21, 2011.

FEINBERG, H. et al. Crystal structure of the CUB1-EGF-CUB2 region of mannose-binding protein associated serine protease-2. **EMBO J.**, v.22, p.2348-59, 2003.

FERRARONI, N.R. et al. Mannose-binding lectin and MBL-associated serine protease-2 gene polymorphisms in a Brazilian population from Rio de Janeiro. **Int. J. Immunogenet.**, v.39, p.32-8, 2012.

FERUCCI, E.D., TEMPLIN, D.W., LANIER, A.P. Rheumatoid arthritis in American Indians and Alaska Natives: a review of the literature. **Semin Arthritis Rheum.**, v.34, n.4, p.662-7, 2005.

FIANE, A.E. et al. Mechanism of complement activation and its role in the inflammatory response after thoracoabdominal aortic aneurysm repair. **Circulation**, v.108, p.849-56, 2003.

FRAUENKNECHT, V. et al. Plasma levels of mannan-binding lectin (MBL)-associated serine proteases (MASPs) and MBL-associated protein in cardio- and cerebrovascular diseases. **Clin Exp Immunol.**, v.173, n.1, p.112-20, 2013.

FRIEDERIKSEN, P.D. et al. Quantification of mannan-binding lectin. **J Immunol Methods.**, v.31, p.49-60, 2006.

GÁL, P. et al. A true autoactivating enzyme. Structural insight into MASP-2 activations. **J Biol Chem.**, v.280, p.33435-44, 2005.

GARCIA-LORDEN, M.I. et al. Low clinical penetrance of mannose-binding lectin-associated serine protease 2 deficiency. **J Allergy Clin Immunol.**, v.118, p.1383-6, 2006.

GARCIA-LORDEN, M.I. et al. Mannose-binding lectin and mannose-binding lectin-associated serine protease 2 in susceptibility, severity, and outcome of pneumonia in adults. **J Allergy Clin Immunol.**, v.122, p.368-74, 2008.

GARRED, P. et al. Susceptibility to HIV infection and progression of AIDS in relation to variant alleles of mannose-binding lectin. **Lancet.**, v.25, n.349, p.236-40, 1997.

GARRED, P. et al. Two edged role of mannose binding lectin in rheumatoid arthritis: a cross sectional study. **J Rheumatol.**, v.27, p.26-34, 2000.

GARRED, P. et al. MBL2, FCN1, FCN2 and FCN3-The genes behind the initiation of the lectin pathway of complement. **Mol Immunol.**, v.46, n.14, p.2737-44, 2009.

GOELDNER, I. Investigação da autoimunidade em pacientes com artrite reumatóide e familiares: uma análise clinic-laboratorial. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009. 59 p.

GOELDNER, I. et al. Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and rheumatoid factor in rheumatoid arthritis patients and relatives from Brazil. **Rheumatology (Oxford)**, v.49, n.8, p.1590-3, 2010.

GOELDNER et al. Association of anticyclic citrullinated peptide antibodies with extra-articular manifestations, gender, and tabagism in rheumatoid arthritis patients from southern Brazil. **Clin Rheumatol.**, v.30, n.7, p.975-80, 2011a.

GOELDNER, I. et al. Autoantibodies for gastrointestinal organ-specific autoimmune diseases in rheumatoid arthritis patients and their relatives. **Clin Rheumatol.** v30, n.1, p.99-102, 2011b.

GOODFELLOW, R.M. et al. Soluble complement receptor one (sCR1) inhibits the development and progression of rat collagen-induced arthritis. **Clin Exp Immunol.**, v.119, n.1, p.210-6, 2000.

GRANT, S.F. et al. The inheritance of rheumatoid arthritis in Iceland. **Arthritis Rheum.**, v.44, n.10, p.2247-54, 2001.

GRAUDAL, N.A. et al. The association of variant MBL genotypes with radiographic outcome in rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.**, v.43, p.515-21, 2000.

GRAUDAL, N.A. et al. Variant mannose-binding lectin genotypes and outcome in early versus late rheumatoid arthritis: comment on the article by Ip et al. **Arthritis Rheum.**, v.46, n.2, p.555-6, 2002.

GREEN, P.J. et al. Recognition of the major cell surface glycoconjugates of Leishmania parasites by the human serum mannan-binding protein. **Mol Biochem Parasitol.**, v.66, p.319-328, 1994.

GULLA, K.C. et al. Activation of mannan-binding lectin-associated serine proteases leads to generation of a fibrin clot. **Immunology**, v.129, p.482-95, 2010.

GUO, S.; THOMPSON, E. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. **Biometrics**, v.48, p.361-72, 1992.

HANSEN, T.K. et al. GH strongly affects serum concentrations of mannan-binding lectin: evidence for a new IGF-I independent immunomodulatory effect of GH. **J Clin Endocrinol Metab**, v.86, n.11, p.5383-8. 2001.

HANSEN, S. et al. Collectin 11 (CL-11, CL-K1) is a MASP-1/3-associated plasma collectin with microbial-binding activity. **J Immunol.**, v.185, p.6096–6104, 2010.

HARTSHORN, K.L. et al. Human mannose-binding protein functions as an opsonin for influenza A viruses. **J Clin Investig.**, v.91, p.1414-20, 1993.

HÉJA, D. et al. Revised mechanism of complement lectin-pathway activation revealing the role of serine protease MASP-1 as the exclusive activator of MASP-2. **PNAS**, v.109, p.10498-10503, 2012.

HEMMINKI, K. et al. Familial associations of rheumatoid arthritis with autoimmune diseases and related conditions. **Arthritis Rheum.**, v.60, n.3, p.661-8, 2009.

HIETALA, M.A. et al. Complement activation by both classical and alternative pathways is critical for the effector phase of arthritis. **Eur J Immunol.**, v.34, p.1208–16, 2004.

HITCHON, C.A. et al. Antibodies to *Porphyromonas gingivalis* are associated with anticitrullinated protein antibodies in patients with rheumatoid arthritis and their relatives. **J. Rheumatol.**, v.37, p.1105-12, 2010.

HOLMSKOV, U., THIEL, S.; JENSENIUS, J.C. Collections and ficolins: humoral lectins of the innate immune defense. **Annu Rev Immunol.**, v.21, p.547-78. 2003.

HOLOSHITZ J, et al. An HLA-DRB1-coded signal transduction ligand facilitates inflammatory arthritis: a new mechanism of autoimmunity. **J Immunol.**, v.190, p.48-57, 2013.

HOVIND, P. et al. Mannose-binding lectin as a predictor of microalbuminuria in type 1 diabetes. **Diabetes**, v.64, p.1523-27, 2005.

HUIZINGA, T. W. J. et al. Refining the complex rheumatoid arthritis phenotype based on specificity of the HLA-DRB1 shared epitope for antibodies to citrullinated proteins. **Arthritis Rheum.**, v.52, n.11, p.3433-3438, 2005.

HUNTER, W. Oral sepsis as a cause of disease. **Br Med J.**, v.2, p.215–6, 1900.

IKEDA, K., et al. Serum lectin with known structure activates complement through the classical pathway. **J Biol Chem.**, v.262, p.7451-54, 1987.

IBGE. Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**, Rio de Janeiro, v.30, 2009.

IOBST, S.T. et al. Binding of sugar ligando to Ca<sup>2+</sup> dependent animal lectins. Analysis of mannose binding by site-directed mutagenesis and NMR. **J Biol Chem.**, v.169, p.15505-511, 1994.

IP, W.K. et al. Mannose-binding lectin and rheumatoid arthritis in southern Chinese. **Arthritis Rheum.**, v.43, p.1679-87, 2000.

ISAACS, J.D. The changing face of rheumatoid arthritis: sustained remission for all? **Nat Rev Immunol.**, v.10, p.605-10, 2010.

ISRAËLS, J. et al. Mannose-binding lectin and the risk of HIV transmission and disease progression in children: a systematic review. **Pediatr Infect Dis J.**, v.31, n. 12, p.1272-8, 2012.

JACOBSEN, S. et al. The influence of the mannose binding lectin polymorphisms on disease outcome in early polyarthritis. **J Rheumatol**, v.28, n.5, p.935-24, 2001.

JACOBSEN, S. et al. Mannose-binding lectin gene polymorphisms are associated with disease activity and physical disability in untreated, anti-cyclic citrullinated peptide-positive patients with early rheumatoid arthritis. **J Rheumatol**, v. 36, n. 4, p. 731-5, 2009.

JAHN, B. et al. Interaction of the terminal complement components C5b–9 with synovial fibroblasts: binding to the membrane surface leads to increased levels in collagenase- specific mRNA. **Immunology**, v.78, p.329–34, 1993.

JIANG, Y. et al. Meta-analysis of 125 rheumatoid arthritis-related single nucleotide polymorphisms studied in the past two decades. **PLoS One**, v.7, p.e51571, 2012.

JORDAN, J.E.; MONTALTO, M.C.; STAHL, G.L. Inhibition of MBL reduces postischemic myocardial reperfusion injury. **Circulation**, v.104, n.12, p.1413-8, 2001.

JOSTINS, L. et al. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature*, v.491, p.119-24, 2012.

KATSCHKE, K.J.J. et al. A novel inhibitor of the alternative pathway of complement reverses inflammation and bone destruction in experimental arthritis. **J Exp Med.**, v.204, n.6, p.1319-25, 2007.

Kawasaki N, Kawasaki T, Yamashina I. Isolation and characterization of a mannan-binding protein from human serum. **J Biochem.**, v.94, p.937-47, 1983.

KERR, F.K. et al. Elucidation of the substrate specificity of the MASP-2 protease of the lectin complement pathway and identification of the enzyme as a major physiological target of the serpin, C1-inhibitor. **Mol Immunol.**, v.45, p.670-7, 2008.

KILPATRICK, D.C. Mannan-binding lectin: clinical significance and applications. **Biochim Biophys Acta.**, v.1572, n.2-3, p.401-13, 2002.

KISHIMOTO, T. IL-6: from its discovery to clinical applications. *Int Immunol.*, v.22, p.347-52, 2010.

KLARESKOG, L. et al. Genes, environment and immunity in the development of rheumatoid arthritis. **Curr Opin Immunol.**, v.18, p.650-5, 2006.

KUDO-TANAKA, E. et al. Autoantibodies to cyclic citrullinated peptide 2 (CCP2) are superior to other potential diagnostic biomarkers for predicting rheumatoid arthritis in early undifferentiated arthritis. **Clin Rheumatol.**, v. 26, n. 10, p. 1627-33, 2007.



KWOH, C.K. et al. Age, sex, and the familial risk of rheumatoid arthritis. **Am J Epidemiol.**, v.144, n. 1, p.15-24, 1996.

LAU, Y.L. et al. Mannose-binding protein in Chinese patients with systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum.**, v.39, p.706-8, 1996.

LHOTTA, K.; WURZNER, R.; KONING, P. Glomerular deposition of MBL in human glomerulonephritis. **Nephrol Dial Transplant.**, v.14, n.4, p.881-86, 1999.

LI, G. et al. Interleukin-17A promotes rheumatoid arthritis synoviocytes migration and invasion under hypoxia by increasing MMP2 and MMP9 expression through NF- $\kappa$ B/HIF-1 $\alpha$  pathway. **Mol Immunol.**, v.53, n.3, p.227-36, 2013a.

LI, G. ; DIOGO, D. ; WU, D., et al. Human genetics in rheumatoid arthritis guides a high-throughput drug screen of the CD40 signaling pathway. **PLoS Genet.**, v.9, n.5, e1003487, 2013b.

LISTING, J.; GERHOLD, K.; ZINK, A. The risk of infections associated with rheumatoid arthritis, with its comorbidity and treatment. **Rheumatology (Oxford)**, v.52, n.1, p.53-61, 2013.

LIU, Y. et al. Human M-ficolin is a secretory protein that activates the lectin complement pathway. **J Immunol.**, v. 175, p.3150-56, 2005.

LIU, L.L. et al. Glomerular mannose-binding lectin deposition is a useful prognostic predictor in IgA nephropathy. **Clin Exp Immunol.**, v.174, p.152-60.

LOSSIUS, A. et al. Epstein-Barr virus in systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and multiple sclerosis—association and causation. **Viruses**, v.4, n.12, p.3701-30, 2012.

LUNDKVIST, J.; KASTANG, F.; KOBELT, G. The burden of rheumatoid arthritis and access to treatment: health burden and costs. **Eur J Health Econ.**, v.8, suppl 2, p.S49-60, 2008.

MACGREGOR, A.J. et al. Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. **Arthritis Rheum.**, v.43, p.30-7, 2000.

MADSEN, H.O. et al. A new frequent allele is the missing link in the structural polymorphism of the human MBL. **Immunogenetics**, v.40, p.37-44, 1994.

MAFFEI, G. et al. Plasma levels of mannan-binding lectin in relation to periodontitis and smoking. **J Periodontol.**, v.76, n.11, p.1881-9, 2005.

MANOLIO, T.A. et al. Finding the missing heritability of complex diseases. **Nature**, v.461, n.7265, p.747- 53, 2009.

MAJITHIA, V.; GERACI, S.A. Rheumatoid arthritis: diagnosis and management. **Am J Med.**, v.120, n.11, p.936-9, 2007.

MAKINDE, V.A. et al. Reflection of disease activity in rheumatoid arthritis by indices of activation of the classical complement pathway. **Ann Rheum Dis.**, v.48, p.302-6, 1989.

MALHOTRA, R. et al. Glyco- sylation changes of IgG associated with rheumatoid arthritis can activate complement via the mannose-binding protein. **Nat Med.**, v.1, p.237e43, 1995.

MAN, Y. A. et al. Women with rheumatoid arthritis negative for anti-CCP and rheumatoid factor are more likely to improve during pregnancy, whereas in autoantibody positive women autoantibody levels are not influenced by pregnancy. **Ann Rheum Dis.**, v.69, n.2, p.420-3, 2009.

MARQUES, J.F.N. et al. Estudo multicêntrico da prevalência da Artrite Reumatóide do adulto em amostras da população brasileira. **Rev Bras Reumatol.**, v.33, n.5, p.169-73, 1993.

MARTINY, F.L. et al. Mannose-binding lectin gene polymorphisms in Brazilian patients with rheumatoid arthritis. **J Rheumatol.**, v.39, n.1, p.6-9, 2012.

MATSUSHITA, M.; FUJITA, T. Activation of the classical complement pathway by mannose-binding protein in association with a novel C1s-like serine protease. **J Exp Med.**, v.176, p.1497-1502, 1992.

MATSUSHITA, M. et al. Activation of the lectin complement pathway by ficolins. **Int Immunopharmacol.**, v.1, p.359-63, 2001.

MATSUSHITA, M. et al. Activation of the lectin complement pathway by H-ficolin (Hakata antigen). **J Immunol.**, v.168, p.3502-6, 2002.

MAURIELLO, C.T. et al. A novel peptide inhibitor of classical and lectin complement activation including ABO incompatibility. **Mol Immunol.**, v.53, n.1-2, p.132-9, 2013.

MAURY, C.P. et al. Variant mannose-binding lectin 2 genotype is a risk factor for reactive systemic amyloidosis in rheumatoid arthritis. **J Intern Med.**, v.262, n.4, p.466-9, 2007.

McGILL, P.E.; OYOO, G.O. Rheumatic disorders in Sub-saharan Africa. **East Afr. Med.**, v.79, p.214-16, 2002.

MICHOU, L. et al. Prevalence and distribution of autoimmune diseases in 368 rheumatoid arthritis families. **J Rheumatol.**, v.35, n.5, p.1-7, 2008.

MIKULS, T.R. et al. Cigarette smoking, disease severity, and autoantibody expression in African Americans with recent-onset rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis.**, v.67, n.11, p.1529-34, 2008.

MILLER, C. et al. Molecular defects in the mannose binding lectin pathway in dermatological disease: Case report and literature review. **Clin Mol Allergy**, v.8, p.6, 2010.

MILLER, M.E. et al. A familial plasma-associated defect of phagocytosis. **Lancet**, v.2, p.60-3, 1968.

MITSUNAGA, S. et al. Exome sequencing identifies novel rheumatoid arthritis-susceptible variants in the BTNL2. **J Hum Genet.**, v.58, n.4, p.210-5, 2013.

MINCHINTON, R. M.; DEAN, M. M.; CLARK, T. R., et al. Analysis of the relationship between mannose-binding lectin (MBL) genotype, MBL levels and function in an Australian blood donor population. **Scand J Immunol.**, v.56, n.6, p.630-41, 2002.

MOELANTS, E.A. et al. Regulation of TNF- $\alpha$  with a focus on rheumatoid arthritis. **Immunol Cell Biol.**, v.91, p.393-401, 2013.

MOLENAAR, E.T. et al. Complement activation in patients with rheumatoid arthritis mediated in part by C-reactive protein. **Arthritis Rheum.**, v.44, p.997–1002, 2001.

MOLLER-KRISTENSEN, M. et al. Levels of mannan-binding lectin-associated serine protease-2 in healthy individuals. **J Immunol Methods.**, v.282, p.159-67, 2003.

MOTA, L.M. On mosaics and consensus: Gaudí, Brazil and rheumatoid arthritis. **Rev Bras Reumatol.**, v.52, n.2, p.133-4, 2012.

MOTA, L.M.H. et al. I Consenso 2012 da Sociedade Brasileira de Reumatologia para o tratamento da artrite reumatoide. **Rev. Bras. Reumatol.**, v.52, n.2, 2012.

MYOZEN, K. et al. Functional variants in NFKBIE and RTKN2 involved in activation of the NF- $\kappa$ B pathway are associated with rheumatoid arthritis in Japanese. **PLoS Genet.**, v.8, e1002949, 2012

NAKAMURA, T. Clinical strategies for amyloid A amyloidosis secondary to rheumatoid arthritis. **Mod Rheumatol.**, v.18, n.2, p.109-18, 2008.

NANDAKUMAR, K.S. et al. A recombinant vaccine effectively induces C5a- specific neutralizing antibodies and prevents arthritis. **PLoS ONE**, v.5,p.e13511, 2010.

NAVRATILOVA, Z. et al. *MBL2* gene variation affecting serum MBL is associated with prosthetic joint infection in Czech patients after total joint arthroplasty. **Tissue Antigens.**, v.80, n.5, p.444-51, 2012.

NEBERT, D.W. Proposal for an allele nomenclature system based on the evolutionary divergence of haplotypes. **Hum Mutat.**, v.20, p.463-72, 2000.

NELL-DUXNEUNER, V. et al. Autoantibody profiling in patients with very early rheumatoid arthritis - a follow-up study. **Ann Rheum Dis.**, v.69, n.1, p.169-74, 2009.

OKADA, Y. et al. Meta-analysis identifies nine new loci associated with rheumatoid arthritis in the Japanese population. **Nat Genet.**, v.44, p.511-6, 2012.

OLESEN, H.V. et al. The mannan-binding lectin pathway and lung disease in cystic fibrosis--disfunction of mannan-binding lectin-associated serine protease 2 (MASP-2) may be a major modifier. **Clin Immunol.**, v.121, p.324-31, 2006.

PABLOS, J.L.; CAÑETE, J.D. Immunopathology of rheumatoid arthritis. **Curr Top Med Chem.**, v.13, n.6, p.705-11, 2013.

PANDA, A.K. et al. Mannose binding lectin: a biomarker of systemic lupus erythematosus disease activity. **Arthritis Res Ther.**, v.14, n.5, p.R218, 2012.

PETERSEN, S.V. et al. An assay for the mannan-binding lectin pathway of complement activation. **J Immunol Meth.**, v.257, n.1-2, p.107-16, 2001.

PINHEIRO, G.R.C. Instrumentos de Medida da Atividade da Artrite Reumatóide – Por que e como Empregá-los. **Rev Bras Reumatol.**, v.47, n.5, p.362-5, 2007.

PORTER, R. R. Biochemistry of complement. **Ric Clin Lab**, v.7, n.3, p.191-7, 1977.

QUIRKE, A.M. et al. Heightened immune response to autocitrullinated *Porphyromonas gingivalis* peptidylarginine deiminase: a potential mechanism for breaching immunologic tolerance in rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis.**, 2013 Mar 28. [Epub ahead of print]

RAMASAWMY, R. et al. Association of mannose-binding lectin gene polymorphism but not of mannose-binding serine protease 2 with chronic severe aortic regurgitation of rheumatic etiology. **Clin Vaccine Immunol.**, v.15, p.932-6, 2008.

RAMOS-CASALS, M. et al. Mannose-binding lectin-low genotypes are associated with milder systemic and immunological disease expression in primary Sjögren's syndrome. **Rheumatol.**, v.48, p.65-69, 2009.

RASHID, T.; EBRINGER, A. Autoimmunity in rheumatic diseases is induced by microbial infections via crossreactivity or molecular mimicry. **Autoimmune Dis.**, doi: 10.1155/2012/539282, 2012.

RICKLIN, D. et al. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. **Nat Immunol.**, v.11, n.9, 2010.

RIIS, A.L. et al. Thyroid hormone increases mannan-binding lectin levels. **Eur J Endocrinol.**, v.153, n.5, p.643-9. 2005.

ROJAS-VILLARRAGA, A. et al. Familial disease, the HLA-DRB1 shared epitope and anti-CCP antibodies influence time at appearance of substantial joint damage in rheumatoid arthritis. **J Autoimmun.**, v.32, n.1, p.64-9, 2009.

ROTHSCHILD, B.M.; TURNER, K.R.; DELUCA, M.A. Symmetrical erosive peripheral polyarthritis in the Late Archaic Period of Alabama. **Science**, v.241, n.4872, p.1498-501, 1988.

RUIZ-ESQUIDE, V.; SANMARTÍ, R. Tobacco and other environmental risk factors in rheumatoid arthritis. **Reumatol Clin.**, v.8, p.342-50, 2012.

SAEVARSDOTTIR, S. et al. Low MBL predicts poor prognosis in patients with early rheumatoid arthritis. A prospective study. **J Rheumatol.**, v.28, p.728-34, 2001.

SAEVARSDOTTIR, S. et al. Mannan binding lectin as an adjunct to risk assessment for myocardial infarction in individuals with enhanced risk. **J Exp Med.**, v.201, n.1, p.117-25, 2005.

SAEVARSDOTTIR, S. et al. Patients with rheumatoid arthritis have higher levels of mannan-binding lectin than their first-degree relatives and unrelated controls. **J Rheumatol.**, v.34, n.8, p.1692-5, 2007.

SALLIOT, C.; VAN DER HEIJDE, D. Long-term safety of methotrexate monotherapy in patients with rheumatoid arthritis: a systematic literature research. **Ann Rheum Dis.**, v.68, p.1100–14, 2009.

SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A.R. DNA sequencing with chainterminating inhibitors. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v.74,n.12, p.5463-7,1977.

SANTOS, I.K. et al. Mannan-binding lectin enhances susceptibility to visceral leishmaniasis. **Infect Immun.**, v.69, n.8, p.5212-5, 2001.

SASTRY, K.,et al. The human mannose-binding protein gene. Exon structure reveals its evolutionary relationship to a human pulmonary surfactant gene and localization to chromosome 10. **J Exp Med.**, v.170, p.1175-89, 1989.

SATO, Y. et al. Complement activating properties of monoreactive and polyreactive IgM rheumatoid factors. **Ann Rheum Dis.**, v.52, p.795–800, 1993.

SAWCER, S. et al. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. **Nature**, v.10, p.214-9, 2011.

SCHAFRANSKI, M.D., et al. High-producing *MBL2* genotypes increase the risk of acute and chronic carditis in patients with history of rheumatic fever. **Mol Immunol.**, v.45, n.14, p.3827-31, 2008a.

SCHAFRANSKI, M.D. et al. Functional *MASP2* gene polymorphism in patients with history of rheumatic fever. **Hum Immunol.**, v.69, p.41-4, 2008b.

SCHELLEKENS, G.A. et al. Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. **J Clin Invest.**, v.101, p.273–28, 1998.

SCHLAPBACH, L.J. et al. Deficiency of mannose-binding lectin-associated serine protease-2 associated with increased risk of fever and neutropenia in pediatric cancer patients. **Pediatr Infect Dis J.**, v.26, p.989–94, 2007.

SEIBOLD, F. et al. Genetic variants of the MBL are associated with immune reactivity to mannans in Crohn's disease. **Gastroenterol.**, v.127, n.4, p.1076-84, 2004.

SEPPÄNEN, M. et al. Mannose-binding lectin 2 gene polymorphism in recurrent herpes simplex virus 2 infection. **Human Immunol.**, v.70, p.218-21, 2009.

SGHIRI, R. et al. Value of anti-mutated citrullinated vimentin antibodies in diagnosing rheumatoid arthritis. **Rheumatol Int.**, v.29, n.1, p.59-62, 2008.

SHERIFF, S.; CHANG, C.Y.; EZERKOWITZ, R.A.B. Human mannose-binding protein carbohydrate recognition domain trimerizes through a triple  $\alpha$ -helical coiled coil. **Nat Struct Biol.**, v.1, p.789-94, 1994.

SHIOZAWA, S.; HAYASHI, S.; TSUKAMOTO, Y. Identification of the gene loci that predispose to rheumatoid arthritis. **Int Immunol.**, v.10, n.12, p.1891-5, 1998.

SILMAN, J.A.; PEARSON, J.E. Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. **Arthritis Res.**, v.4, suppl.3, p. S265-72, 2002.

SJÖBERG, A. et al. The extracellular matrix and inflammation: fibromodulin activates the classical pathway of complement by directly binding C1q. **J Biol Chem.**, v.280, p.32301–8, 2005.

SMOLEN, J.S.; STEINER, G. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. **Nat Rev Drug Discov.**, v.2, p.473-88, 2003.

SMOLIK, I. et al. First-degree relatives of patients with rheumatoid arthritis exhibit high prevalence of joint symptoms. **J Rheumatol.**, v.40, n. 6, p.818-24, 2013.

SOLOMON, D.H. et al. Unresolved questions in rheumatology: motion for debate: the data support evidence-based management recommendations for cardiovascular disease in rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.**, v.65, p.1675-83, 2013.

SORENSEN, R.; THIEL, S.; JENSENIUS, J. C. Mannan-binding-lectin-associated serine proteases, characteristics and disease associations. **Curr Opin Rheumatol.**, v.20, n.3, p.327-33, 2008.

SORENSEN, C.M. et al. Hormonal regulation of mannan-binding lectin synthesis in hepatocytes. **Clin Exp Immunol.**, v.145, p.173-82, 2006.

STEINBROCKER, O. ; TRAEGER, C.H. ; BATTERMAN, R.C. Therapeutic criteria in rheumatoid arthritis. **JAMA**, v.140, p.659-62, 1949.

STENGAARD-PEDERSEN, K. et al. Inherited deficiency of mannan-binding lectin-associated serine protease 2. **N Engl J Med.**, v.349, p.554-60, 2003.

STOVER, C.M. et al. Assignment of the gene encoding MASP-2 to human chromosome 1p36.3-->p36.2 by in situ hybridization and somatic cell hybrid analysis. **Cytogenet Cell Genet.**, v.84, p.148-9, 1999.

STOVER, C.M. et al. The human gene for mannan-binding lectin-associated serine protease-2, the effector component of the lectin route of complement activation, is part of a tightly linked gene cluster on chromosome 1p36.2-3. **Genes Immun.**, v.2, p.119-27, 2001.

STOVER, C.M. et al. Functional MASP2 single nucleotide polymorphism plays no role in psoriasis. **Br J Dermatol.**, v.152, p.1313-5, 2005.

STURFELT, G.; TRUEDSSON, L. Complement in the immunopathogenesis of rheumatic disease. **Nat Rev Rheumatol.**, v.8, n.8, p.458-68, 2012.

SULIVAN, K.E. et al. Mannose-binding protein genetic polymorphisms in black patients with systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum.**, v.39, p.2046-51, 1996.

SUNYER, J.O. ; ZARKADIS, I.K. ; LAMBRIS, J.D. Complement diversity: a mechanism for generating immune diversity? **Immunol Today.**, v.19, p.519-23, 1998.

SUPER, M. et al. Association of low levels of mannan-binding protein with a common defect of opsonisation. **Lancet**, v.2, p.1236-39, 1989.

SWAAK, A.J. et al. An analysis of the levels of complement components in the synovial fluid in rheumatic diseases. **Clin Rheumatol.**, v.6, p.350–357, 1987.

SWIERZKO, A.S.; KILPATRICK, D.C.; CEDZYNSKI, M. Mannan-binding lectin in malignancy. **Mol Immunol.**, v.55, n.1, p.16-21, 2013.

TAKADA, F. et al. Localization of the genes for the 100-kDa complement-activating components of Ra-reactive factor (CRARF and Crarf) to human 3q27-q28 and mouse 16B2-B3. **Genomics**, v.25, p.757-9, 1995.

TAKAHASHI, K. et al. Mannose-binding lectin and its associated proteases (MASPs) mediate coagulation and its deficiency is a risk factor in developing complications from infection, including disseminated intravascular coagulation. **Immunobiology**, v.216, n.1-2, p.96-102, 2011.

TAYLOR, M.E. et al. Structure and evolutionary origin of the gene encoding a human serum mannan-binding protein. **Biochem J.**, v.262, p.763–71, 1989.

TEDESCHI, S.K.; BERMAS, B.; COSTENBADER, K.H. Sexual disparities in the incidence and course of SLE and RA. **Clin Immunol.**, v.66, n.13, p.16-21, 2013.

TEHLIRAN, C.V.; BATHON, J.M. Rheumatoid arthritis: Clinical and Laboratory Manifestations . In: STONE, J.H., CROFFORD, L.J. WHITE, P.H. **Primer on the rheumatic diseases**. 30 ed. New York: Springer, 2008. p.114-121.

THIEL, S. et al. A second serine protease associated with mannan-binding lectin that activates complement. **Nature**, v.386, p.506-10, 1997.

THIEL, S. et al. Deficiency of mannan-binding lectin associated serine protease-2 due to missense polymorphisms. **Genes Immun.**, v.8, p.154-63, 2007(a).

THIEL, S. Complement activating soluble pattern recognition molecules with collagen-like regions, mannan-binding lectin, ficolins and associated proteins. **Mol Immunol.**, v.44, p.3875-88, 2007 (b).

THIEL, S. et al. Polymorphisms in mannan-binding lectin (MBL)-associated serine protease 2 affect stability, binding to MBL, and enzymatic activity. **J Immunol.**, v.182, p.2939-47, 2009.

THIEL, S. et al. Mannan-binding lectin (MBL)-associated serine protease-1 (MASP-1), a serine protease associated with humoral pattern-recognition molecules: normal and acute-phase levels in serum and stoichiometry of lectin pathway components. **Clin Exp Immunol.**, v.169, p.38-48, 2012.

TONKS, S. et al. HLA class I DNA typing study. In: Charron, D. **HLA: genetic diversity of HLA functional and medical implication**. Paris: EDK p.199-215. 1997.

TROESEN, A. et al. K. Ultrasound versus magnetic resonance arthrography in acetabular labral tear diagnostics: a prospective comparison in 20 dysplastic hips. **Acta Radiol.**, v.48, n.9, p.1004-10, 2007.

TROESEN, L.N. et al. Double role of mannose-binding lectin in relation to carotid intima-media thickness in patients with rheumatoid arthritis. **Mol Immunol.**, v.47, p.713-8, 2010.

TROUW, L.A. et al. Genetic variants of C1q are a risk for rheumatoid arthritis. **Ann. Rheum. Dis.**, v.70, Suppl.2, p.A17, 2011.

TSUTSUMI, A. et al. Mannose-binding lectin gene: polymorphisms in Japanese patients with systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and Sjögren's syndrome. **Genes Immun.**, v.2, n.2, p.99-104.

TURESSON C. Extra-articular rheumatoid arthritis. **Curr Opin Rheumatol.**, v.25, n.3, p.360-6, 2013.

TURNER, M.W.; HAMVAS, R.M. Mannose-binding lectin: structure, function, genetics, and disease associations. **Rev Immunogenet.**, v.2, p.305-22, 2000.

UNTERBERGER, C. et al. Stat3 is involved in control of *MASP2* gene expression. **Biochem Biophys Res Commun.**, v.364, p.1022-5, 2007.



UTIYAMA, S.R. et al. [Serological screening of relatives of celiac disease patients: antiendomysium antibodies, anti-tissue transglutaminase or both?]. **Arq Gastroenterol.**, v.44, p.156-61, 2007.

VALDIMARSSON, H. et al. Human plasma-derived MBL: a phase I safety and pharmacokinetic study. **Scand J Immunol.**, v.59, p.97-102, 2004.

VALLÈS, X. et al. Genetic and structural analysis of MBL2 and MASP2 polymorphisms in south-eastern African children. **Tissue Antigens.**, v.74, p.298-307, 2009.

VAN DE GEIJN, F.E. et al. Mannose-binding lectin polymorphisms are not associated with rheumatoid arthritis--confirmation in two large cohorts. **Rheumatology (Oxford)**, v.47, n8, p.1168-71, 2008.

VAN DE STADT, L.A. et al. Development of the anti-citrullinated protein antibody repertoire prior to the onset of Rheumatoid Arthritis. **Arthritis Rheum.**, v.63, n.11, p.3226-33, 2011.

VANDER CRUYSEN, B. et al. Polymorphisms in the ficolin 1 gene (FCN1) are associated with susceptibility to the development of rheumatoid arthritis. **Rheumatology (Oxford)**, v.46, n.12, p.1792-5, 2007.

VAN DER ENDE, J. et al. Bone healing and mannose-binding lectin. **Int J Surg.**, v.11, n.4, p.296-300, 2013.

VAN NIES, J.A. et al. What is the evidence for the presence of a therapeutic window of opportunity in rheumatoid arthritis? A systematic literature review. **Ann Rheum Dis.**, 2013 Apr 9. [Epub ahead of print]

VIAATTE, S.; PLANT, D.; RAYCHAUDHURI, S. Genetics and epigenetics of rheumatoid arthritis. **Nat Rev Rheumatol.**, v.9, n.3, p.141-53, 2013.

XIE, Q. et al. Association of MIF-173G/C and MBL2 codon 54 gene polymorphisms with rheumatoid arthritis: a meta-analysis. **Hum Immunol.**, v.73, n.9, p.966-71, 2012.

WAALER, E. On the occurrence of a factor in human serum activating the specific agglutination of sheep blood corpuscles.1939. **APMIS**, v.115, p.422-38, 2007.

WALLIS, R. Dominant effects of mutations in the collagenous domain of mannose-binding protein. **J Immunol.**, v.168, n.9, p.4553-8, 2002.

WALPORT, M.J. Complement. First of two parts. **N Engl J Med.**, v.344, n.14, p.1058-66, 2001.

WANG, M. et al. Mannan-binding lectin regulates dendritic cell maturation and cytokine production induced by lipopolysaccharide. **BMC Immunol.**, v.12, p.1, 2011.

WEIS, W.I.; DRICKAMER, K. Trimeric structure of a C-type mannose-binding protein. **Structure**, v.2, n.12, p.1227-40, 1994.

WERTH, V.P. al. MBL polymorphisms associated with low MBL production in patients with dermatomyositis. **J Invest Dermatol.**, v.119, p.1394–9, 2002.

WILLEMZE, A. et al. The influence of anti-CCP status and characteristics on the course of RA. **Nat Rev Rheumatol.**, v.8, p.144–52, 2012.

WOUDE, D. et al. Epitope spreading of the anti-citrullinated protein antibody response occurs before disease onset and is associated with the disease course of early arthritis. **Ann Rheum Dis.**, v.69, n.8, p.1554-61, 2010.

YOUNG, K.A. et al. Relatives without rheumatoid arthritis show reactivity to anti-citrullinated protein/peptide antibodies which are associated with arthritis-related traits: Studies of the etiology of rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.**, v.65, p.1995-2004, 2013.

YTTING, H. et al. Biological variation in circulating levels of mannan-binding lectin (MBL) and MBL-associated serine protease-2 and the influence of age, gender and physical exercise. **Scand J Immunol.**, v.66, p.458-64, 2007.

ZAMPELI, E. et al. Detection of subclinical synovial inflammation by microwave radiometry. **PLoS One.**, v.8, n.5, e64606, 2013.

ZENG, Q.Y. et al. Rheumatic diseases in China. **Arthritis Res Ther.**, v.10, R17, 2008.

ZHANG, M. et al. MASP-2 activation is involved in ischemia-related necrotic myocardial injury in humans. **Int J Cardiol.**, v.166, n.2, p.499-504, 2011.

## APÊNDICES

APÊNDICE 1 - DADOS DEMOGRÁFICOS E DOSAGENS DE MBL E MASP-2 DOS PACIENTES COM AR.....	121
APÊNDICE 2 - GENÓTIPOS DE <i>MBL2</i> E <i>MASP2</i> EM PACIENTES COM AR .....	125
APÊNDICE 3 - CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E SOROLÓGICAS DOS PACIENTES COM AR.....	128
APÊNDICE 4 - DADOS DEMOGRÁFICOS E DOSAGENS DE MBL E MASP-2 DOS FAMILIARES.....	135
APÊNDICE 5 - GENÓTIPOS DE <i>MBL2</i> E <i>MASP2</i> EM FAMILIARES .....	139
APÊNDICE 6 - CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E SOROLÓGICAS DOS FAMILIARES.....	143
APÊNDICE 7 - DADOS DEMOGRÁFICOS E DE MBL DO GRUPO CONTROLE..	147
APÊNDICE 8 - DADOS DEMOGRÁFICOS E DE MASP-2 DO GRUPO CONTROLE .....	154
APÊNDICE 9 - REAGENTES UTILIZADOS NA PCR-SSP MULTIPLEX I .....	159
APÊNDICE 10 - REAGENTES UTILIZADOS NA PCR-SSP MULTIPLEX II .....	159
APÊNDICE 11 - REAGENTES UTILIZADOS NA PCR-SSP <i>p.D120G</i> .....	160

## CODIFICAÇÕES

Para “GÊNERO”: 1 = masculino  
2 = feminino

Para “ETNIA”: 1 = euro-brasileiro  
2 = afrodescendente  
3 = ameríndio  
4 = oriental

ND = não determinado  
SI = sem informação  
S = sim  
N = não

**APÊNDICE 1 - DADOS DEMOGRÁFICOS E DOSAGENS DE MBL E MASP-2 DOS  
PACIENTES COM AR**

<b>Código</b>	<b>Gênero</b>	<b>Idade</b>	<b>Etnia</b>	<b>[MBL] ng/ml</b>	<b>[MASP-2] ng/ml</b>
AR006	1	48	2	100	237
AR007	2	52	1	268	256
AR009	2	39	1	100	156
AR010	2	80	1	562	125
AR012	1	67	2	400	192
AR014	2	60	1	1053	ND
AR016	1	56	1	2130	ND
AR018	2	41	2	100	287
AR019	2	52	1	1458	ND
AR020	2	42	1	100	301
AR021	2	31	1	1212	ND
AR022	2	30	1	1650	112
AR023	2	37	2	1362	185
AR024	2	34	1	280	ND
AR025	2	42	1	925	1099
AR026	2	51	1	302	223
AR027	2	44	2	ND	626
AR028	2	68	1	100	373
AR032	2	29	1	1836	167
AR033	2	36	1	1770	411
AR034	2	54	1	897	172
AR037	2	65	1	400	42
AR038	2	24	2	3463	270
AR039	2	26	1	100	ND
AR040	2	51	1	100	ND
AR041	2	40	1	1010	ND
AR042	2	59	1	2310	893
AR043	2	54	1	709	1128
AR044	1	55	1	1650	ND
AR045	2	48	2	100	146
AR046	2	49	1	100	ND
AR047	2	71	1	551	681
AR048	2	55	2	220	197
AR049	2	50	1	532	1200
AR052	1	60	1	1161	ND
AR053	2	46	1	100	898
AR054	1	24	1	532	ND
AR055	2	44	1	2550	ND
AR056	2	59	1	524	ND
AR057	2	37	1	1968	ND
AR058	2	36	1	1794	430
AR059	2	45	2	100	ND
AR060	1	34	1	444	182
AR061	2	41	1	ND	360
AR063	2	65	1	551	ND
AR065	2	30	2	400	81
AR067	1	54	1	463	ND
AR068	2	42	1	259	ND
AR069	2	55	1	1446	693
AR071	2	66	1	246	ND
AR072	2	53	1	1901	ND
AR074	1	26	1	310	ND

<b>Código</b>	<b>Gênero</b>	<b>Idade</b>	<b>Etnia</b>	<b>[MBL] ng/ml</b>	<b>[MASP-2] ng/ml</b>
AR076	2	58	1	444	ND
AR077	2	76	1	501	ND
AR078	2	50	1	100	ND
AR079	1	55	1	100	309
AR083	2	57	1	1188	ND
AR085	2	66	1	6640	ND
AR087	2	51	1	100	157
AR088	2	69	1	486	ND
AR092	2	65	1	275	ND
AR095	2	80	2	896	203
AR097	2	61	1	100	252
AR098	2	58	1	1458	102
AR100	1	59	1	4562	416
AR102	2	30	1	257	ND
AR103	1	54	2	1434	323
AR107	2	48	1	100	ND
AR108	2	61	1	1150	530
AR109	1	55	1	234	ND
AR112	2	27	1	243	ND
AR115	2	63	1	820	ND
AR118	2	47	1	1680	208
AR119	2	37	1	1600	200
AR120	2	55	2	100	ND
AR122	2	44	2	100	759
AR123	2	53	2	1347	1048
AR124	2	54	2	2960	454
AR125	2	60	1	100	300
AR126	2	54	1	869	ND
AR127	2	51	2	3140	301
AR128	2	62	1	444	199
AR129	2	59	1	259	ND
AR130	2	53	1	2140	188
AR132	2	41	2	1400	92
AR133	2	49	1	1410	100
AR134	2	33	1	100	ND
AR136	2	59	2	1850	134
AR137	2	44	1	1800	330
AR138	2	48	1	209	ND
AR139	2	55	1	1900	170
AR140	2	84	1	265	112
AR141	2	53	2	300	88
AR142	2	44	3	1977	323
AR143	2	51	1	1830	194
AR144	2	53	2	2750	ND
AR145	1	50	1	315	697
AR147	2	59	1	471	200
AR150	2	44	1	869	224
AR151	2	40	1	1780	63
AR152	2	47	1	207	21
AR153	1	57	1	900	26
AR154	2	80	1	1128	68
AR155	2	63	1	100	111
AR157	2	51	1	844	152
AR158	2	75	1	390	70
AR159	2	32	1	870	61

<b>Código</b>	<b>Gênero</b>	<b>Idade</b>	<b>Etnia</b>	<b>[MBL] ng/ml</b>	<b>[MASP-2] ng/ml</b>
AR160	2	52	1	100	ND
AR161	2	44	1	100	227
AR162	2	50	2	1890	90
AR164	2	57	2	680	67
AR165	1	61	1	1850	148
AR166	2	44	2	1050	84
AR167	2	50	1	100	170
AR168	2	59	2	100	83
AR170	1	57	1	838	88
AR171	2	37	1	2100	112
AR172	2	74	2	100	112
AR173	2	46	1	433	344
AR174	2	57	1	400	104
AR175	2	58	1	876	43
AR176	2	47	1	ND	91
AR177	1	32	1	100	ND
AR178	2	55	1	ND	181
AR179	2	51	2	850	120
AR180	2	55	1	100	63
AR181	2	46	1	100	161
AR182	2	54	1	202	55
AR183	2	37	2	250	110
AR185	2	52	2	1100	219
AR186	2	32	1	100	ND
AR187	1	45	1	550	193
AR188	2	63	2	1242	299
AR190	1	59	2	100	265
AR191	2	48	1	2300	310
AR192	2	55	1	424	65
AR193	2	53	2	1685	109
AR194	2	31	1	265	ND
AR195	2	73	2	100	ND
AR196	2	65	1	100	ND
AR197	2	45	2	254	247
AR198	2	58	2	ND	262
AR199	2	57	1	100	207
AR200	2	65	1	224	ND
AR202	2	38	1	425	204
AR203	2	61	1	1500	79
AR204	2	66	1	100	ND
AR205	2	59	1	1800	83
AR206	2	54	2	477	ND
AR209	2	33	1	100	280
AR210	2	65	1	ND	142
AR211	2	55	1	100	ND
AR212	2	42	1	1138	ND
AR213	2	57	1	100	324
AR214	2	54	1	100	ND
AR215	2	51	1	100	ND
AR216	2	39	1	3200	60
AR217	2	69	1	3700	237
AR218	2	61	1	100	181
AR219	2	40	1	1049	159
AR220	2	53	1	580	222
AR222	2	54	2	1800	221

<b>Código</b>	<b>Gênero</b>	<b>Idade</b>	<b>Etnia</b>	<b>[MBL] ng/ml</b>	<b>[MASP-2] ng/ml</b>
AR223	2	59	1	500	87
AR224	2	54	1	454	181
AR225	1	42	1	100	114
AR226	2	57	1	100	91
AR227	2	55	1	ND	61
AR228	2	59	1	4725	136
AR229	2	47	1	515	89
AR230	2	56	1	2299	52
AR232	2	29	1	2525	156
AR233	1	40	1	3806	160
AR234	1	31	2	1660	38
AR235	2	43	1	1726	52
AR237	1	54	1	100	53
AR238	2	40	1	2862	181
AR239	2	50	1	2700	180
AR241	1	62	1	2000	83
AR242	2	63	1	2800	56
AR243	2	46	2	1870	83
AR244	2	65	2	1668	30
AR245	2	46	1	100	497
AR246	1	44	1	1800	503
AR247	1	27	1	484	832
AR248	2	50	2	100	30
AR249	1	53	2	100	597
AR250	2	43	2	2131	605
AR251	2	43	1	403	234
AR 252	2	18	1	1250	91
AR253	2	50	1	ND	316
AR254	2	58	1	1868	156
AR255	2	55	1	100	234
AR256	1	67	1	2208	731
AR257	2	50	1	ND	515
AR258	2	28	1	1800	39
AR259	2	58	1	ND	290
AR261	2	36	1	750	56
AR262	2	61	1	100	99
AR263	2	42	1	500	220
AR264	2	50	1	100	57
AR265	2	56	2	1800	200
AR266	1	39	1	433	167
AR268	1	60	1	1200	267
AR269	2	50	1	ND	355
AR270	2	55	2	1400	222
AR271	2	53	1	100	286
AR272	2	61	1	670	175
AR273	1	77	2	1042	526
AR274	2	27	2	1900	326

NOTA: [MASP-2] < 200 ng/ml = baixa; 200 - 600 ng/ml = intermediária; ≥ 600 ng/ml = alta.  
[MBL] ≤ 100 ng/ml = baixa; 100 - 1000 ng/ml = intermediária; ≥ 1000 ng/ml = alta.

APÊNDICE 2 - GENÓTIPOS DE *MBL2* E *MASP2* EM PACIENTES COM AR

<b>Código</b>	<b>Genótipos <i>MBL2</i></b>		<b>Genótipos <i>MASP2</i></b>	
AR006	LXPA	HYPD	*1B1-h	*1B1-h
AR007	LYQA	HYPD	*2B1-i	*1B1-h
AR009	HYP A	HYPD	*2B2A-i	*1B1-h
AR010	HYP A	HYPD	*2B2A-i	*2B1-i
AR012	LYQA	LYPB	*2B2A-i	*1B1-h
AR018	LXPA	LYPB	*2B2A-i	*2B2A-i
AR020	LYPB	LYPB	*2B2A-i	*1B1-h
AR022	HYP A	LYQA	*2B1-i	*1B1-h
AR023	HYP A	HYP A	*2B2A-i	*1C2-I
AR025	LYQA	LYPB	*2B2A-i	*2A1
AR026	LXPA	LYPB	*2B2A-i	*2B2A-i
AR027	LYQA	LYPB	*2B2A-i	*2B1-i
AR028	LXPA	LXPA	*2B2A-i	*2B2A-i
AR032	HYP A	HYP A	*2B2A-i	*2B2A-i
AR033	LYPA	LXPA	*2B2A-i	*2B1-i
AR034	LYPA	LXPA	*2B1-i	*1C2-I
AR037	LXPA	LXPA	*2B2A-i	*2B2B-I
AR038	HYP A	LYQA	*2B2A-i	*1B1-h
AR042	HYP A	LXPA	*2B2A-i	*1B1-h
AR043	LYQA	LYPB	*2B2A-i	*1B1-h
AR045	LXPA	LXPA	*2B2A-i	*1A
AR047	HYP A	HYPD	*2B2A-i	*2B2A-i
AR048	HYP A	LYPB	*2B2A-i	*2B2A-i
AR049	LYQA	LYPB	*1B1-h	*1B1-h
AR053	HYPD	HYPD	*2B2A-i	*2B2A-i
AR058	HYP A	HYP A	*2B1-i	*1B1-h
AR060	HYP A	LYPB	*2B2A-i	*1B2-h
AR061	HYP A	HYP A	*2B2A-i	*2B2A-i
AR065	LYQA	LYPB	*2A2-I	*1C2-I
AR069	LYPA	LYQA	*1B1-h	*1B1-h
AR079	HYPD	LYPB	*2B2A-i	*1B1-h
AR087	HYPD	HYPD	*2B2A-i	*2B2A-i
AR095	LYQA	LYQC	*2B2A-i	*1B1-h
AR097	LXPA	LXPA	*2B2A-i	*2B2A-i
AR098	HYP A	LXPA	*2B2A-i	*1A
AR100	LYQA	LYQA	*2B2A-i	*2B2A-i
AR103	HYP A	HYP A	*2B1-i	*2B1-i
AR108	HYP A	HYP A	*2B2A-i	*2B2A-i
AR118	LYPA	LYQA	*2B2A-i	*2B1-i
AR119	HYP A	HYP A	*2B2A-i	*1A
AR122	LYQC	LYQC	*2B2A-i	*1A
AR123	HYP A	LXPA	*2A1	*2A1
AR124	HYP A	LXPA	*2B2A-i	*2B1-i
AR125	LXPA	HYPD	*2B2A-i	*2B2A-i
AR127	HYP A	HYP A	*2A1	*1A
AR128	LYPA	LYPB	*2B2A-i	*2B2A-i
AR130	LYPA	LXPA	*2B2A-i	*1B1-h
AR132	LYPA	LYPA	*2B2A-i	*2B2A-i
AR133	HYP A	HYP A	*2B2A-i	*2A2-I
AR136	HYP A	LYPA	*2B2A-i	*2A1
AR137	HYP A	LYQA	*2B2A-i	*1B1-h
AR139	LYPA	LXPA	*2B2A-i	*2B2A-i
AR140	LXPA	LYPB	*2B2A-i	*2A1



<b>Código</b>	<b>Genótipos <i>MBL2</i></b>		<b>Genótipos <i>MASP2</i></b>	
AR141	LYPA	HYPD	*2B1-i	*1B1-h
AR142	HYP A	LYQA	*2B2A-i	*1B1-h
AR143	HYP A	LYQA	*2B2A-i	*2B1-i
AR145	LYPA	LYPB	*2B2A-i	*1B1-h
AR147	HYP A	LYPB	*2B2A-i	*2B1-i
AR150	LYQA	LYPB	*2B2A-i	*2B2A-i
AR151	LXPA	LYQA	*2B2A-i	*2A2-l
AR152	LYPA	LYPB	*2B2A-i	*2B2B-l
AR153	LYPA	LYPB	*2B2A-i	*2B1-i
AR154	LXPA	LYQA	*2B2A-i	*2B1-i
AR155	LXPA	LYPB	*2B2A-i	*2B2A-i
AR157	LYPA	HYPD	*2B2A-i	*2B2A-i
AR158	HYP A	LYPB	*2B2A-i	*2B2A-i
AR159	LYQA	LYPB	*2B2A-i	*2B2A-i
AR160	LYQA	LYPB	*2B2A-i	*2B2A-i
AR162	HYP A	LYPA	*2B1-i	*1B1-h
AR164	LYQA	LYPB	*2B2A-i	*1B1-h
AR165	HYP A	LYQA	*2B2A-i	*1B1-h
AR166	HYP A	HYP A	*2B2A-i	*1A
AR167	HYPD	LYPB	*2B2A-i	*2B2A-i
AR168	HYPD	LYPB	*2B2A-i	*2B2A-i
AR170	HYP A	LYQC	*2B2A-i	*1B1-h
AR171	HYP A	LYQA	*2B2A-i	*2B2A-i
AR172	LXPA	LXPA	*2B2A-i	*1A
AR173	HYP A	LYPB	*1A	*1B1-h
AR174	HYP A	LYPB	*2B2A-i	*2B2A-i
AR175	LYQA	LYPB	*2B2A-i	*2B2A-i
AR176	HYP A	LYPB	*2B2A-i	*1B1-h
AR178	LYPA	LYPB	*2B2A-i	*2B2A-i
AR179	LYQA	LYPB	*2B2A-i	*2B2A-i
AR180	HYPD	LYPB	*2B2A-i	*2B2A-i
AR181	HYPD	LYPB	*2B2A-i	*2B2A-i
AR182	LYQA	LYPB	*2B2A-i	*2B1-i
AR183	LXPA	LYPB	*2B1-i	*1A
AR185	HYP A	LXPA	*2B1-i	*1B1-h
AR187	LYPA	LYQC	*1B1-h	*1B1-h
AR188	LYPA	LYQA	*2B2A-i	*2B2A-i
AR190	LYPB	LYQC	*2B2A-i	*2B2A-i
AR191	LYQA	LYQA	*2B2A-i	*2B2A-i
AR192	HYP A	LYPB	*2B2A-i	*2A2-l
AR193	LXPA	LYQA	*2B2A-i	*2A2-l
AR197	HYP A	LYPB	*2B1-i	*1B1-h
AR198	LYPA	LYPB	*2B2A-i	*1A
AR199	LYPB	LYPB	*2B2A-i	*2B2A-i
AR202	LYPA	LYQC	*2B2A-i	*2B2A-i
AR203	LYPA	LXPA	*2B2B-l	*1A
AR205	HYP A	LYQA	*1B1-h	*1C2-l
AR209	LXPA	LYPB	*2B2A-i	*2B2A-i
AR210	LYQA	LYPB	*2B2A-i	*2B1-i
AR213	LXPA	HYPD	*2B2A-i	*2B2A-i
AR216	HYP A	HYP A	*2B2A-i	*1C2-l
AR217	LYQA	LYQA	*2B2A-i	*1B1-h
AR218	LXPA	LXPA	*2B2A-i	*1B1-h
AR219	LYPA	LXPA	*2B2A-i	*2B1-i
AR220	HYP A	LYPB	*2B2A-i	*2B2A-i

<b>Código</b>	<b>Genótipos <i>MBL2</i></b>		<b>Genótipos <i>MASP2</i></b>	
AR222	HYP A	LYQA	*2B2A-i	*2B2A-i
AR223	HYP A	LYPB	*2B2A-i	*1B1-h
AR224	HYP A	LYPB	*2B2A-i	*1B1-h
AR225	LXPA	LYQC	*2B2A-i	*2A1
AR226	LXPA	LXPA	*2B2A-i	*2B1-i
AR227	LYQA	LYPB	*2B1-i	*2B1-i
AR228	LYQA	LYQA	*2B2A-i	*1B1-h
AR229	LYQA	LYQC	*2B2A-i	*2B2A-i
AR230	LYQA	LYQA	*2B2A-i	*2B1-i
AR232	HYP A	LXPA	*1B1-h	*1B1-h
AR233	HYP A	LXPA	*1B1-h	*1B1-h
AR234	LXPA	LYQA	*2B2A-i	*1A
AR235	HYP A	HYP A	*2B2A-i	*2B2A-i
AR237	LXPA	LXPA	*2B2A-i	*2B2A-i
AR238	HYP A	LXPA	*2B1-i	*1B1-h
AR239	HYP A	LXPA	*2B1-i	*2B1-i
AR241	HYP A	LYP A	*2B2A-i	*2B2A-i
AR242	HYP A	HYP A	*2B2A-i	*2A2-l
AR243	HYP A	LYQA	*2B1-i	*1B1-h
AR244	LYP A	LXPA	*2B2A-i	*2B2A-i
AR245	LYPB	LYPB	*2B1-i	*1B1-h
AR246	LXPA	LYQA	*2B2A-i	*1B1-h
AR247	HYP A	HYPD	*2B2A-i	*1B1-h
AR248	LYPB	LYPB	*2B2B-l	*1C2-l
AR249	LXPA	HYPD	*2B1-i	*1A
AR250	HYP A	LYQA	*1B1-h	*1B1-h
AR251	HYP A	LYPB	*2B2A-i	*2B2A-i
AR252	HYP A	HYP A	*2B2A-i	*2B2A-i
AR253	HYP A	LYPB	*2B2A-i	*2B2A-i
AR254	HYP A	LXPA	*2B2A-i	*2B2A-i
AR255	HYPD	LYPB	*2B2A-i	*2B2A-i
AR256	LXPA	LYQA	*2B2A-i	*2A1
AR257	LYP A	LYPB	*2B2A-i	*1B2-h
AR258	HYP A	LYP A	*2B2A-i	*2B2A-i
AR259	LXPA	LYQA	*2B2A-i	*2B1-i
AR261	HYP A	LYPB	*2B2A-i	*2B2A-i
AR262	LYPB	LYPB	*2B2A-i	*2B2A-i
AR263	LYQA	LYPB	*2B2A-i	*2B2A-i
AR264	LYPB	LYQC	*2B2A-i	*2B2A-i
AR265	HYP A	LXPA	*2B2A-i	*2A2-l
AR266	HYP A	LYPB	*2B2A-i	*2B2A-i
AR268	HYP A	LYPB	*2B2A-i	*2B2A-i
AR269	HYP A	LYQA	*2B2A-i	*2B2A-i
AR270	HYP A	LXPA	*2B2A-i	*1A
AR271	LXPA	LXPA	*2B2A-i	*2B2A-i
AR272	HYP A	HYPD	*2B2A-i	*2B2A-i
AR273	HYP A	LYPB	*2B1-i	*1A
AR274	LYQA	LYQA	*2B1-i	*1B1-h

## APÊNDICE 3 - CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E SOROLÓGICAS DOS PACIENTES COM AR

Código	Anti-CCP	FR-IgM	Classe funcional	Nódulos	Sjögren	Doença cardiovascular	Infecção recorrente	Abortos	Tabagismo	Idade de início da doença	Duração da doença
AR006	155	0	2	S	N	N	N	N	S	45	3
AR007	19	0	1	N	N	N	N	N	N	25	27
AR009	7	1920	3	N	N	N	N	N	N	39	0
AR010	168	0	4	N	S	N	N	N	N	69	11
AR012	216	240	1	N	SI	N	S	N	N	62	5
AR014	9	0	3	N	N	N	N	N	N	49	11
AR016	253	3840	1	N	N	S	N	N	N	52	4
AR018	13	0	1	N	N	N	S	N	N	23	18
AR019	19	60	2	S	S	N	N	N	S	47	5
AR020	171	0	1	N	SI	N	N	S	S	33	9
AR021	245	60	1	S	S	N	N	N	N	29	2
AR022	11	120	1	N	SI	N	N	N	N	23	7
AR023	82	30	2	N	N	N	S	N	N	25	12
AR024	178	120	2	N	N	N	N	N	N	28	6
AR025	171	240	1	N	N	N	N	N	N	38	4
AR026	8	0	1	S	SI	N	S	S	S	45	6
AR027	59	30	1	S	S	N	SI	N	S	39	5
AR028	189	0	2	S	N	N	N	N	S	33	35
AR032	157	0	1	N	S	N	N	N	N	18	11
AR033	169	0	1	N	N	N	N	N	S	31	5
AR034	175	7680	1	N	N	N	S	N	N	33	21
AR037	111	30	2	N	S	N	S	N	N	62	3
AR038	51	240	2	N	N	N	N	N	N	24	0
AR039	223	480	2	N	S	N	N	N	N	26	0
AR040	109	3840	3	N	S	N	N	N	S	51	0
AR041	163	240	2	N	N	N	N	N	N	31	9
AR042	173	480	3	N	N	N	N	N	N	43	16
AR043	92	480	2	N	SI	N	N	N	N	54	0
AR044	77	3840	2	S	S	N	N	N	N	28	27
AR045	29	30	1	S	SI	N	S	N	S	27	21
AR046	8	480	2	N	N	N	N	N	S	41	8

Código	Anti-CCP	FR-IgM	Classe funcional	Nódulos	Sjögren	Doença cardiovascular	Infecção recorrente	Abortos	Tabagismo	Idade de início da doença	Duração da doença
AR047	209	60	2	N	SI	N	N	N	S	71	0
AR048	202	60	1	N	N	N	N	N	S	55	0
AR049	87	60	1	N	S	N	N	N	N	30	20
AR052	188	480	3	N	N	N	N	N	S	48	12
AR053	24	480	2	N	N	N	S	N	S	44	2
AR054	13	0	1	N	N	N	N	N	N	21	3
AR055	202	0	2	N	S	N	N	N	N	25	19
AR056	34	480	1	N	N	N	N	N	N	53	6
AR057	7	60	2	N	N	N	N	N	N	36	1
AR058	16	0	1	N	SI	N	S	N	N	25	11
AR059	9	0	1	N	SI	N	N	N	N	25	20
AR060	13	0	1	S	N	N	SI	N	S	28	20
AR061	141	120	1	N	N	N	N	N	S	22	12
AR063	35	480	1	N	N	N	N	N	N	64	1
AR065	58	0	2	N	S	N	S	N	N	19	11
AR067	86	240	1	S	S	N	N	N	S	54	0
AR068	8	0	1	N	N	N	N	N	N	35	7
AR069	160	0	2	N	N	S	N	N	S	45	10
AR071	217	0	2	N	S	N	N	N	S	60	6
AR072	21	480	2	S	S	N	N	N	N	46	7
AR074	144	3840	1	N	N	N	N	N	S	24	2
AR076	184	480	1	N	N	N	N	N	S	53	5
AR077	11	0	1	N	SI	N	N	N	S	75	1
AR078	15	0	1	N	SI	N	N	N	S	47	3
AR079	8	0	1	N	S	N	N	N	S	53	2
AR083	25	0	1	N	N	N	N	N	N	47	10
AR085	182	480	2	N	S	S	N	N	N	55	11
AR087	115	240	1	N	S	N	N	N	N	46	5
AR088	250	480	1	N	N	S	N	N	S	52	17
AR092	245	480	2	N	S	S	N	N	S	29	36
AR095	36	120	3	N	S	N	S	N	S	65	15
AR097	124	0	1	N	S	N	N	N	N	53	8
AR098	11	0	1	N	N	N	N	N	N	54	4

Código	Anti-CCP	FR-IgM	Classe funcional	Nódulos	Sjögren	Doença cardiovascular	Infecção recorrente	Abortos	Tabagismo	Idade de início da doença	Duração da doença
AR100	8	120	1	N	N	N	N	N	N	54	5
AR102	8	0	2	N	N	N	N	N	S	23	7
AR103	120	240	2	S	N	N	N	N	S	47	7
AR107	248	480	1	N	N	S	N	S	N	48	0
AR108	213	960	3	N	N	S	N	N	S	50	11
AR109	224	480	3	N	N	N	N	N	N	45	10
AR112	190	480	1	N	N	N	N	N	S	27	0
AR115	125	120	1	N	N	N	N	N	S	60	3
AR118	129	480	3	N	S	N	S	N	N	37	10
AR119	38	240	1	N	N	N	N	N	N	30	7
AR120	192	960	2	N	N	N	N	N	N	50	5
AR122	7	0	2	N	N	N	S	N	N	43	1
AR123	8	0	2	N	N	N	N	N	S	40	13
AR124	186	480	3	N	S	N	S	N	N	40	14
AR125	253	480	2	N	S	N	S	N	N	49	11
AR126	8	30	2	N	N	N	N	N	S	50	4
AR127	158	0	2	N	N	N	N	N	S	50	1
AR128	242	480	2	N	S	N	N	N	S	55	7
AR129	221	480	3	N	N	N	N	N	N	29	30
AR130	60	120	2	N	N	S	N	N	N	24	29
AR132	25	240	2	N	S	N	N	N	N	29	12
AR133	185	0	3	S	N	N	N	N	N	25	24
AR134	33	30	2	N	N	N	N	N	N	32	1
AR136	50	960	2	N	N	N	N	N	N	49	10
AR137	186	960	1	N	N	S	N	N	S	42	2
AR138	254	480	2	N	N	N	N	N	S	32	16
AR139	60	120	1	N	N	S	N	N	N	44	11
AR140	129	0	2	N	S	N	S	N	N	83	1
AR141	10	0	1	N	N	N	S	N	S	50	3
AR142	221	120	1	N	N	N	N	N	N	44	0
AR143	99	480	3	N	N	N	N	N	S	47	4
AR144	211	480	1	N	S	N	N	N	N	53	0
AR145	10	0	3	N	N	N	N	N	S	28	22

Código	Anti-CCP	FR-IgM	Classe funcional	Nódulos	Sjögren	Doença cardiovascular	Infecção recorrente	Abortos	Tabagismo	Idade de início da doença	Duração da doença
AR147	208	480	4	N	S	N	N	N	N	49	10
AR150	50	480	1	N	S	N	N	N	N	43	1
AR151	191	1920	1	N	N	N	N	N	S	30	10
AR152	193	160	3	N	N	N	N	N	S	38	9
AR153	120	320	2	N	N	N	N	N	N	53	4
AR154	67	120	2	N	N	N	S	N	S	20	60
AR155	221	3840	2	N	N	N	N	S	N	58	5
AR157	54	1920	1	N	N	N	N	N	N	47	4
AR158	41	60	3	N	N	N	N	N	N	36	39
AR159	7	0	2	N	N	N	N	N	N	30	2
AR160	16	0	1	N	N	N	SI	N	N	46	6
AR161	216	120	1	N	N	N	N	N	S	36	8
AR162	142	0	1	N	N	N	N	N	S	46	4
AR164	227	480	2	N	N	N	N	N	S	54	3
AR165	238	480	2	N	N	N	N	N	S	55	6
AR166	10	60	2	N	S	N	S	N	S	36	8
AR167	12	60	1	N	N	N	S	N	N	48	2
AR168	37	480	1	N	N	N	S	N	S	50	9
AR170	244	60	2	N	S	N	S	N	N	49	8
AR171	19	0	1	N	N	N	N	N	S	27	10
AR172	70	0	1	N	N	N	N	N	N	66	8
AR173	8	0	2	N	N	N	N	N	N	43	3
AR174	246	0	1	N	N	N	N	S	N	56	1
AR175	69	480	3	N	N	N	N	N	N	53	5
AR176	31	240	1	N	S	N	SI	N	N	46	1
AR177	122	480	3	N	N	N	N	N	N	25	7
AR178	14	0	2	N	N	N	SI	N	S	54	1
AR179	10	0	2	N	S	N	S	N	S	43	8
AR180	19	60	1	N	N	N	N	N	N	50	5
AR181	93	480	2	N	N	N	N	N	N	20	26
AR182	22	3840	1	N	S	N	S	N	S	43	11
AR183	233	480	1	N	N	S	N	N	S	30	7
AR185	102	60	1	N	N	N	N	N	N	37	15

Código	Anti-CCP	FR-IgM	Classe funcional	Nódulos	Sjögren	Doença cardiovascular	Infecção recorrente	Abortos	Tabagismo	Idade de início da doença	Duração da doença
AR186	16	0	2	N	N	N	N	N	N	22	10
AR187	226	480	1	N	S	N	N	N	S	31	14
AR188	137	60	1	N	S	N	N	N	N	58	5
AR190	227	240	2	N	S	N	N	N	S	45	14
AR191	109	480	2	N	N	N	N	N	N	30	18
AR192	234	480	1	N	S	N	N	N	N	47	8
AR193	27	120	4	N	S	N	N	N	S	24	29
AR194	158	240	2	N	N	N	N	N	N	27	4
AR195	29	60	1	N	N	N	N	N	S	73	0
AR196	37	120	1	N	N	N	N	N	N	50	15
AR197	216	60	2	N	N	N	S	N	S	38	7
AR198	6	0	1	N	N	N	SI	N	N	51	7
AR199	30	0	1	N	N	N	S	S	S	49	8
AR200	7	0	1	N	SI	N	N	N	N	63	2
AR202	7	60	1	N	N	N	N	N	N	34	4
AR203	190	480	1	N	S	N	N	N	S	41	20
AR204	100	0	2	N	N	S	N	N	N	66	0
AR205	44	120	2	N	N	N	N	N	N	57	2
AR206	107	240	4	S	N	N	N	N	N	50	4
AR209	46	120	1	N	S	N	N	N	N	31	2
AR210	230	1920	1	N	S	N	SI	N	N	50	15
AR211	68	480	4	N	N	N	N	N	N	49	6
AR212	56	0	1	N	N	N	N	N	N	41	1
AR213	233	120	2	N	N	N	N	N	N	46	11
AR214	254	0	1	N	N	N	N	S	N	45	9
AR215	12	0	3	N	N	N	N	S	S	38	13
AR216	44	0	1	N	N	N	N	N	N	27	12
AR217	172	256	1	N	SI	N	N	N	N	46	0
AR218	192	512	3	N	SI	N	N	N	S	35	26
AR219	109	32	2	N	S	N	N	N	N	24	16
AR220	166	512	1	N	SI	N	N	N	N	46	1
AR222	243	256	2	S	SI	N	N	N	N	23	31
AR223	115	512	2	N	N	N	N	N	S	43	16

Código	Anti-CCP	FR-IgM	Classe funcional	Nódulos	Sjögren	Doença cardiovascular	Infecção recorrente	Abortos	Tabagismo	Idade de início da doença	Duração da doença
AR224	13	0	1	N	N	N	N	N	S	48	6
AR225	8	0	3	N	N	N	N	N	S	35	7
AR226	229	64	1	N	SI	N	N	N	S	51	6
AR227	7	0	1	N	N	N	SI	N	N	51	4
AR228	233	32	1	N	SI	S	N	N	N	46	0
AR229	168	1024	2	N	SI	N	N	N	N	35	12
AR230	6	0	1	N	SI	N	N	N	S	44	12
AR232	196	128	1	N	S	N	N	N	N	29	1
AR233	236	256	2	N	SI	N	N	N	S	33	4
AR234	6	32	1	N	S	N	N	N	S	31	1
AR235	146	512	1	N	SI	N	N	N	N	39	4
AR237	72	0	1	N	SI	N	N	N	N	46	1
AR238	9	0	1	N	SI	N	N	N	N	39	2
AR239	236	128	2	N	S	N	N	N	N	46	1
AR241	202	128	1	N	N	N	N	N	S	59	3
AR242	36	128	2	N	N	N	N	N	S	59	4
AR243	169	64	2	N	SI	N	N	N	N	46	0
AR244	238	32	2	N	N	N	N	N	N	45	20
AR245	142	32	1	N	SI	N	N	N	N	43	3
AR246	168	128	2	N	SI	N	N	N	N	44	1
AR247	70	32	1	N	N	N	N	N	N	25	2
AR248	216	1024	1	N	N	N	N	N	S	45	5
AR249	172	32	2	N	SI	N	N	N	N	50	3
AR250	243	512	2	S	SI	N	N	N	S	38	5
AR251	14	0	2	N	SI	N	N	N	N	41	2
AR 252	9	0	2	N	SI	N	N	N	N	18	0
AR253	9	0	2	N	N	N	SI	N	N	47	3
AR254	248	512	2	N	N	N	N	N	N	54	4
AR255	73	0	2	N	N	N	N	N	S	50	5
AR256	206	128	1	N	SI	N	N	N	n	63	4
AR257	128	64	2	N	SI	N	SI	N	S	50	1
AR258	98	32	2	N	SI	N	N	N	N	16	12
AR259	23	0	2	N	N	N	SI	N	N	42	16



<b>Código</b>	<b>Anti-CCP</b>	<b>FR-IgM</b>	<b>Classe funcional</b>	<b>Nódulos</b>	<b>Sjögren</b>	<b>Doença cardiovascular</b>	<b>Infecção recorrente</b>	<b>Abortos</b>	<b>Tabagismo</b>	<b>Idade de início da doença</b>	<b>Duração da doença</b>
AR261	134	256	2	N	N	N	N	N	S	27	9
AR262	238	64	2	N	SI	N	N	N	S	46	15
AR263	134	64	1	N	SI	N	N	N	S	37	5
AR264	206	64	3	N	SI	N	N	N	S	48	2
AR265	47	256	2	S	SI	N	N	N	N	54	1
AR266	168	64	1	N	SI	N	N	N	N	39	1
AR268	152	0	1	N	SI	N	N	N	S	54	6
AR269	8	256	1	N	SI	N	SI	N	S	46	1
AR270	29	64	2	N	SI	N	N	N	S	50	5
AR271	196	128	2	N	S	N	N	N	S	38	15
AR272	168	64	1	N	SI	N	N	N	N	53	8
AR273	13	32	2	N	S	N	N	N	S	69	8
AR274	7	0	1	N	SI	N	N	N	N	24	3

NOTA: Anti-CCP positivo =  $\geq 20$  U/ml; FR-IgM positivo =  $\geq 30$  U/ml; Classe funcional = classes I, II, III e IV; Duração da doença = em anos; SI = sem informação.

**APÊNDICE 4 - DADOS DEMOGRÁFICOS E DOSAGENS DE MBL E MASP-2 DOS FAMILIARES**

<b>Código</b>	<b>Gênero</b>	<b>Idade</b>	<b>Etnia</b>	<b>[MBL] ng/ml</b>	<b>[MASP-2] ng/ml</b>
F001	2	47	1	4200	ND
F002	2	40	2	4120	ND
F003	1	44	1	100	ND
F004	1	52	1	3890	ND
F005	2	36	1	1020	ND
F006	2	48	1	525	ND
F007	2	38	1	2200	ND
F008	2	15	1	4300	ND
F009	2	29	1	2241	ND
F010	2	26	1	2600	ND
F011	2	29	1	1050	ND
F012	2	29	1	1280	ND
F013	1	48	2	4300	ND
F014	2	47	2	100	ND
F015	2	25	1	5500	73
F016	2	46	1	4320	308
F017	2	63	1	100	ND
F018	2	55	1	100	ND
F019	2	39	1	4200	ND
F020	1	33	1	980	216
F021	2	31	1	780	279
F022	2	52	2	5400	ND
F023	2	10	2	4800	ND
F024	2	14	2	880	ND
F025	1	30	2	100	ND
F026	2	49	1	100	198
F027	2	53	1	100	30
F028	1	60	1	1300	200
F029	1	57	1	180	ND
F030	1	16	2	1640	ND
F031	1	28	1	3890	ND
F032	2	51	1	1780	ND
F033	1	32	1	1780	ND
F034	2	12	1	1850	ND
F035	2	36	2	1350	274
F036	1	24	1	2500	ND
F037	2	21	1	4890	ND
F038	2	52	1	190	523
F039	2	23	1	3980	ND
F040	2	42	1	100	ND
F041	1	38	1	1120	ND
F042	2	45	1	2100	178
F043	1	7	2	100	ND
F044	2	13	1	100	ND
F045	2	16	1	430	ND
F046	2	9	2	100	284
F047	2	37	1	890	ND
F048	2	26	1	240	ND
F049	2	35	1	2300	ND
F051	1	37	2	100	ND
F052	1	14	1	100	ND
F053	2	54	2	5230	ND

<b>Código</b>	<b>Gênero</b>	<b>Idade</b>	<b>Etnia</b>	<b>[MBL] ng/ml</b>	<b>[MASP-2] ng/ml</b>
F054	2	55	1	4890	ND
F055	2	39	1	520	ND
F056	2	56	1	998	ND
F057	1	31	1	1100	ND
F058	1	40	2	990	ND
F059	1	11	2	4200	ND
F060	2	34	2	2200	ND
F061	1	45	1	3890	ND
F062	1	13	1	850	ND
F063	2	33	1	180	ND
F065	1	34	1	100	ND
F066	1	37	1	165	1464
F067	1	30	1	100	ND
F068	1	38	1	450	ND
F069	2	31	1	100	925
F070	1	55	2	890	ND
F071	1	14	1	690	ND
F072	2	25	1	1300	231
F073	2	30	1	320	ND
F074	2	51	1	1200	ND
F075	2	56	1	350	194
F076	2	73	1	2250	231
F077	1	44	1	925	ND
F078	1	30	1	723	ND
F079	2	28	1	840	ND
F080	1	36	1	100	ND
F081	1	26	1	4980	ND
F082	1	28	1	1270	ND
F083	2	32	1	100	ND
F084	1	22	2	750	ND
F085	1	21	2	100	ND
F086	2	17	2	720	858
F087	2	17	2	5600	1200
F088	2	17	1	4800	323
F089	1	24	2	990	ND
F090	1	26	2	100	ND
F091	2	65	2	100	635
F092	2	56	2	1250	ND
F093	2	67	1	820	ND
F094	2	54	1	2100	ND
F095	2	68	2	2300	ND
F096	2	40	2	1200	ND
F097	1	16	1	1150	ND
F098	2	32	1	1650	ND
F099	2	42	1	1250	286
F100	2	33	1	1650	197
F101	2	13	1	884	ND
F102	1	48	1	5800	235
F103	2	43	1	2200	ND
F104	1	47	1	480	ND
F105	2	41	1	4600	ND
F106	1	13	1	620	ND
F107	1	48	1	100	ND
F108	2	21	1	320	ND
F109	1	31	1	1980	ND

<b>Código</b>	<b>Gênero</b>	<b>Idade</b>	<b>Etnia</b>	<b>[MBL] ng/ml</b>	<b>[MASP-2] ng/ml</b>
F110	1	29	1	4144	ND
F111	2	29	1	650	523
F112	1	63	1	1090	ND
F113	2	56	1	2050	ND
F114	1	38	1	1200	ND
F115	2	65	2	550	205
F116	1	37	2	850	ND
F118	2	25	2	295	ND
F119	2	40	1	100	ND
F120	1	21	1	4200	ND
F121	1	30	1	100	ND
F122	1	56	1	500	121
F123	1	35	1	4650	ND
F124	1	37	1	4200	265
F127	2	49	1	260	ND
F128	1	38	1	5600	ND
F129	1	27	1	4800	97
F130	1	41	1	100	ND
F131	2	18	1	650	ND
F132	1	31	1	420	ND
F133	2	91	1	5200	ND
F134	2	49	1	520	1011
F135	2	70	1	770	201
F136	1	31	1	820	ND
F137	2	48	1	520	ND
F138	2	63	1	1850	ND
F139	1	37	1	450	ND
F140	2	46	1	4200	363
F141	2	46	1	100	205
F142	1	43	1	890	ND
F143	2	54	1	294	ND
F144	1	26	1	502	1646
F145	2	67	1	5800	529
F146	1	70	1	465	ND
F147	2	44	1	100	ND
F148	2	52	1	350	552
F149	2	54	1	100	ND
F150	2	56	2	1217	ND
F151	2	39	1	424	ND
F152	1	15	1	1708	ND
F153	2	34	1	1390	343
F155	1	35	1	4800	ND
F156	2	48	1	560	ND
F157	1	24	1	239	ND
F158	1	43	1	4200	ND
F159	2	51	1	604	117
F160	1	32	2	1270	ND
F161	2	40	1	468	ND
F162	2	26	1	1300	ND
F163	1	55	2	5200	ND
F164	2	45	1	550	308
F165	1	72	1	620	ND
F166	1	49	1	3800	631
F167	1	47	1	480	371
F168	2	38	1	538	198

<b>Código</b>	<b>Gênero</b>	<b>Idade</b>	<b>Etnia</b>	<b>[MBL] ng/ml</b>	<b>[MASP-2] ng/ml</b>
F169	1	36	1	998	ND
F170	2	41	2	100	ND
F171	1	72	2	100	493
F172	2	34	2	100	795
F173	1	33	2	1053	ND
F174	2	32	2	1013	ND
F175	1	44	1	307	ND
F176	2	30	2	100	ND
F177	2	33	2	781	ND
F178	1	16	1	4492	ND
F179	1	15	2	3408	ND
F180	1	25	2	100	ND
F181	2	17	2	100	ND
F182	2	15	1	206	ND
F184	1	30	1	278	ND
F186	2	32	1	4050	ND
F188	2	42	1	441	699
F189	2	43	1	104	ND
F190	2	11	1	4468	ND
F191	2	39	1	981	ND
F192	1	33	1	904	ND
F193	2	16	1	100	ND
F194	2	32	1	3441	ND
F195	2	33	1	282	ND
F196	2	39	1	146	ND
F197	2	39	1	883	ND
F198	2	31	1	4390	ND
F199	2	27	1	4089	ND
F200	2	23	1	4104	ND
F201	2	18	1	4344	ND
F202	2	38	2	4360	ND
F203	2	15	1	228	ND
F204	2	11	1	245	ND
F205	1	49	1	1035	ND
F206	2	37	1	100	ND
F207	2	20	2	1939	ND
F208	2	26	1	100	ND
F209	2	33	2	200	ND

NOTA: [MASP-2] < 200 ng/ml = baixa; 200 - 600 ng/ml = intermediária; ≥ 600 ng/ml = alta. [MBL] ≤ 100 ng/ml = baixa; 100 - 1000 ng/ml = intermediária; ≥ 1000 ng/ml = alta.

APÊNDICE 5 - GENÓTIPOS DE *MBL2* E *MASP2* EM FAMILIARES

<b>Código</b>	<b>Genótipos <i>MBL2</i></b>		<b>Genótipos <i>MASP2</i></b>	
F001	HYP A	LYQA	*2B2A-i	*2B2A-i
F002	HYP A	LYQA	*2B1-i	*1A
F003	ND	ND	ND	ND
F004	ND	ND	ND	ND
F005	ND	ND	ND	ND
F006	ND	ND	ND	ND
F007	ND	ND	ND	ND
F008	ND	ND	ND	ND
F009	ND	ND	ND	ND
F010	ND	ND	ND	ND
F011	ND	ND	ND	ND
F012	ND	ND	ND	ND
F013	ND	ND	ND	ND
F014	ND	ND	ND	ND
F015	HYP A	LYQA	*2B2A-i	*1C2-I
F016	HYP A	LYPA	*2B2A-i	*2B2A-i
F017	LXPA	LYPB	*2B2A-i	*1B1-h
F018	LXPA	LYPB	*2B2A-i	*2B2B-I
F019	HYP A	LXPA	*2B2A-i	*2B2A-i
F020	HYP A	LYPB	*2B2A-i	*2B2A-i
F021	LXPA	HYPD	*2B2A-i	*2B2A-i
F022	ND	ND	ND	ND
F023	ND	ND	ND	ND
F024	ND	ND	ND	ND
F025	ND	ND	ND	ND
F026	LXPA	LYPB	*2B2A-i	*2B2A-i
F027	LXPA	LYPB	*2B2A-i	*2B2B-I
F028	LYQA	LXPA	*2B2A-i	*2B2A-i
F029	ND	ND	ND	ND
F030	ND	ND	ND	ND
F031	ND	ND	ND	ND
F032	ND	ND	ND	ND
F033	LYPA	LXPA	*2B2A-i	*2B2A-i
F034	LYPA	LXPA	*2B2A-i	*1C2-I
F035	HYP A	LYQC	*2B2A-i	*2B1-i
F036	LYPA	LYQA	*2B2A-i	*2B2A-i
F037	HYP A	LYQA	*2B2A-i	*1A
F038	HYP A	LYPB	*2B2A-i	*1A
F039	HYP A	LYQA	*2B2A-i	*1A
F040	LYPA	HYPD	ND	ND
F041	LYQA	LXPA	*2B2A-i	*2B2A-i
F042	HYP A	LXPA	*2B2A-i	*2B1-i
F043	LYPA	HYPD	*2B2A-i	*2B2A-i
F044	HYPD	LYPB	*2B2A-i	*1B1-h
F045	LYQA	LYPB	*2B2A-i	*2B2A-i
F046	LYPA	HYPD	*2B2A-i	*2B2A-i
F047	ND	ND	ND	ND
F048	ND	ND	ND	ND
F049	ND	ND	ND	ND
F051	HYP A	LXPA	*2B2A-i	*2B2A-i
F052	LYPA	LYQC	*2B2A-i	*1A
F053	ND	ND	ND	ND
F054	HYP A	LYQA	ND	ND
F055	ND	ND	ND	ND

<b>Código</b>	<b>Genótipos <i>MBL2</i></b>		<b>Genótipos <i>MASP2</i></b>	
F056	ND	ND	ND	ND
F057	ND	ND	ND	ND
F058	HYP A	HYP A	ND	ND
F059	ND	ND	ND	ND
F060	ND	ND	ND	ND
F061	ND	ND	ND	ND
F062	ND	ND	ND	ND
F063	ND	ND	ND	ND
F065	HYP D	LYP B	*2B2A-i	*2B2A-i
F066	LYP A	LYP B	*2B2A-i	*1B1-h
F067	HYP D	LYP B	*2B2A-i	*2B1-i
F068	LYP A	LYP B	*2B2A-i	*1B1-h
F069	HYP D	LYP B	*2B2A-i	*2B1-i
F070	LYP A	LXP A	*2B2A-i	*2A2-l
F071	LYP A	LYQ A	*2B2A-i	*1B1-h
F072	HYP A	LYQ A	*2B2A-i	*1A
F073	ND	ND	ND	ND
F074	ND	ND	ND	ND
F075	LYP A	LYQ C	*2B2A-i	*1B1-h
F076	HYP A	LYP A	*2B2A-i	*2B1-i
F077	LYQ A	LXP A	*2B2A-i	*1B1-h
F078	LYP A	LXP A	*2B2A-i	*1B1-h
F079	LYP A	LYQ C	*2B2A-i	*1B1-h
F080	LXP A	LYP B	*2B1-i	*2B1-i
F081	HYP A	LYQ A	*2B2A-i	*2B1-i
F082	HYP A	LYQ A	*2B2A-i	*2B2A-i
F083	LXP A	LYP B	*2B2A-i	*1B1-h
F084	HYP A	LYQ C	*2B2A-i	*1B1-h
F085	LYQ A	LYQ C	*2B2A-i	*1B1-h
F086	HYP A	LYQ C	*1B1-h	*2A1
F087	HYP A	LYQ A	*2B2A-i	*1B1-h
F088	HYP A	LYQ A	*2B2A-i	*2B1-i
F089	LYQ A	LYQ C	*2B2A-i	*1B1-h
F090	LXP A	LYQ C	*2B2A-i	*1A
F091	LYP A	LYP B	*2B2A-i	*2B2A-i
F092	LYP A	LXP A	*2B2A-i	*2B2A-i
F093	ND	ND	ND	ND
F094	HYP A	HYP A	*2B2A-i	*1B1-h
F095	ND	ND	ND	ND
F096	HYP A	HYP A	*2B2A-i	*1B1-h
F097	HYP A	LYP B	*2B2A-i	*1B1-h
F098	ND	ND	ND	ND
F099	HYP A	HYP A	*2B2A-i	*2B2A-i
F100	HYP A	LXP A	*2B2A-i	*2B2A-i
F101	LYP A	LYQ A	*2B2A-i	*2B2A-i
F102	HYP A	LYQ A	*2B2A-i	*2B1-i
F103	ND	ND	ND	ND
F104	ND	ND	ND	ND
F105	HYP A	HYP A	*2B2A-i	*2B2A-i
F106	ND	ND	ND	ND
F107	LYQ A	LYP B	*2B2A-i	*2B2A-i
F108	HYP A	LYP B	*2B2A-i	*1B1-h
F109	HYP A	LXP A	*1A	*2A2-l
F110	ND	ND	ND	ND
F111	LYP A	LYP B	*2B2A-i	*1B1-h

Código	Genótipos <i>MBL2</i>		Genótipos <i>MASP2</i>	
F112	LYPA	LYQA	*2B2A-i	*1A
F113	ND	ND	ND	ND
F114	HYP A	LXPA	*2B2A-i	*2B2A-i
F115	LYPA	LYPB	*2B1-i	*2A2-I
F116	HYP A	LYPA	*2B2A-i	*1A
F118	HYPD	LYPB	*2B2A-i	*2B2A-i
F119	LXPA	LYPB	*2B2A-i	*2B2A-i
F120	ND	ND	ND	ND
F121	LYPA	LYPB	*2B2B-I	*1C2-I
F122	HYP A	HYPD	*2B2A-i	*2B2A-i
F123	ND	ND	ND	ND
F124	HYP A	HYP A	*2B2A-i	*2B1-i
F127	HYP A	HYP A	ND	ND
F128	HYP A	HYP A	ND	ND
F129	HYP A	HYP A	*2B2B-I	*2A1
F130	HYP A	LXPA	ND	ND
F131	HYP A	LYQA	ND	ND
F132	LYPA	LYPA	ND	ND
F133	HYP A	HYP A	ND	ND
F134	HYP A	LYPB	*2B2A-i	*2B1-i
F135	HYP A	LYPB	*2B2A-i	*1A
F136	HYP A	HYP A	*2B2A-i	*2B1-i
F137	LYPA	LYQA	*2B1-i	*2B1-i
F138	HYP A	LYPB	*2B2A-i	*2B1-i
F139	HYP A	LYPB	*2B2B-I	*1B1-h
F140	HYP A	LXPA	*2B1-i	*1B1-h
F141	LYPA	LYQA	*2B2A-i	*2B2A-i
F142	ND	ND	ND	ND
F143	LYPA	LXPA	*2B2A-i	*1B1-h
F144	HYP A	LYPB	*1B1-h	*1A
F145	HYP A	HYP A	*2B2A-i	*1B1-h
F146	LYQA	LYQA	*2B2A-i	*2B2A-i
F147	LYQA	HYPD	*2B2A-i	*1B1-h
F148	HYP A	LYQA	*2B2A-i	*1A
F149	LXPA	LXPA	*2B1-i	*1B1-h
F150	LYQA	LYQA	*2B2A-i	*2B2A-i
F151	LYQA	LYPB	*2B2A-i	*2B2A-i
F152	HYP A	LXPA	*2B2A-i	*1A
F153	LYQA	LYPB	*2B2A-i	*2B2A-i
F155	ND	ND	ND	ND
F156	ND	ND	ND	ND
F157	LYQA	LYPB	*2B1-i	*2A2-I
F158	ND	ND	ND	ND
F159	LYQA	LYQC	*2B2A-i	*2B2B-I
F160	HYP A	LYPA	*2B2A-i	*2B2A-i
F161	HYPD	LYPB	*2B2A-i	*2B2A-i
F162	HYP A	HYP A	*1A	*2A1
F163	LYQA	LYQA	*2B2A-i	*2B2A-i
F164	HYP A	LYPB	*2B2A-i	*2B2A-i
F165	LYQA	LYPB	*2B2A-i	*2B2A-i
F166	LYQA	LYQA	*2B2A-i	*2B2A-i
F167	LYQA	LYPB	*2B2A-i	*2B2A-i
F168	HYP A	LYPB	*2B2A-i	*1B1-h
F169	HYP A	LYPB	*2B1-i	*1B1-h
F170	HYPD	LYPB	*2B2A-i	*1C2-I



<b>Código</b>	<b>Genótipos <i>MBL2</i></b>		<b>Genótipos <i>MASP2</i></b>	
F171	HYP A	HYP D	*2B2A-i	*1B1-h
F172	HYP D	LYP B	*2B1-i	*1B1-h
F173	LYQA	LYQA	*1B2-h	*2A2-l
F174	ND	ND	ND	ND
F175	ND	ND	ND	ND
F176	ND	ND	ND	ND
F177	ND	ND	ND	ND
F178	ND	ND	ND	ND
F179	ND	ND	ND	ND
F180	ND	ND	ND	ND
F181	ND	ND	ND	ND
F182	ND	ND	ND	ND
F184	ND	ND	ND	ND
F186	ND	ND	ND	ND
F188	HYP A	LYP B	*2B2A-i	*2B1-i
F189	ND	ND	ND	ND
F190	ND	ND	ND	ND
F191	ND	ND	ND	ND
F192	ND	ND	ND	ND
F193	ND	ND	ND	ND
F194	ND	ND	ND	ND
F195	ND	ND	ND	ND
F196	ND	ND	ND	ND
F197	ND	ND	ND	ND
F198	ND	ND	ND	ND
F199	ND	ND	ND	ND
F200	ND	ND	ND	ND
F201	ND	ND	ND	ND
F202	ND	ND	ND	ND
F203	ND	ND	ND	ND
F204	ND	ND	ND	ND
F205	ND	ND	ND	ND
F206	ND	ND	ND	ND
F207	ND	ND	ND	ND
F208	ND	ND	ND	ND
F209	ND	ND	ND	ND

## APÊNDICE 6 - CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E SOROLÓGICAS DOS FAMILIARES

<b>Código</b>	<b>anti-CCP</b>	<b>FR-IgM</b>	<b>Doença cardiovascular</b>	<b>Aborto</b>	<b>Tabagismo</b>	<b>Sintoma articular</b>
F001	9	0	N	S	N	N
F002	9	0	N	N	N	N
F003	8	0	N	N	N	N
F004	8	0	S	N	N	N
F005	9	0	N	S	N	S
F006	9	0	N	S	S	S
F007	10	0	N	N	N	N
F008	9	0	N	N	N	N
F009	12	0	N	N	N	N
F010	10	0	N	N	S	N
F011	9	0	N	N	S	N
F012	10	0	N	S	S	N
F013	10	30	N	N	S	N
F014	11	0	N	N	N	N
F015	139	60	N	N	N	S
F016	13	0	N	N	N	N
F017	18	0	N	N	N	N
F018	14	0	S	N	N	N
F019	9	0	N	N	N	N
F020	8	30	N	N	S	N
F021	10	0	N	N	N	N
F022	13	0	N	N	N	N
F023	11	0	N	N	N	N
F024	10	0	S	N	N	N
F025	11	0	N	N	N	S
F026	9	0	N	S	N	S
F027	14	0	N	S	S	S
F028	9	0	N	N	N	N
F029	121	0	N	N	N	N
F030	8	0	N	N	N	N
F031	19	0	N	N	N	N
F032	9	0	N	N	N	S
F033	9	0	N	N	S	N
F034	7	0	N	N	N	N
F035	9	0	N	N	S	N
F036	9	0	N	N	N	N
F037	13	0	N	N	N	N
F038	38	0	N	N	S	N
F039	9	0	N	N	N	N
F040	9	0	N	S	S	S
F041	10	0	N	N	N	N
F042	20	30	S	N	N	S
F043	10	0	N	N	N	N
F044	14	0	N	N	N	N
F045	15	0	N	N	N	N
F046	9	0	N	N	N	N
F047	11	30	N	N	N	N
F048	10	0	N	N	N	N
F049	12	0	N	S	N	N
F051	19	0	N	N	N	N

Código	anti-CCP	FR-IgM	Doença cardiovascular	Aborto	Tabagismo	Sintoma articular
F052	11	0	N	N	N	N
F053	10	0	N	N	N	N
F054	9	0	N	S	S	N
F055	14	0	N	N	N	S
F056	10	0	N	N	N	S
F057	10	0	N	N	N	N
F058	10	0	S	N	S	S
F059	10	0	N	N	N	N
F060	9	0	S	N	S	N
F061	9	0	N	N	N	N
F062	10	0	N	N	N	N
F063	9	30	N	N	N	N
F065	9	0	N	N	N	N
F066	33	0	N	N	N	N
F067	9	0	N	N	N	N
F068	10	0	N	N	N	N
F069	232	30	N	N	N	S
F070	10	0	N	N	S	S
F071	10	0	N	N	N	S
F072	11	0	N	N	N	N
F073	9	0	N	N	S	S
F074	9	0	N	N	S	N
F075	10	0	N	S	N	S
F076	10	0	N	N	S	N
F077	9	0	N	N	S	N
F078	11	0	N	N	S	N
F079	9	0	N	N	S	N
F080	9	0	N	N	N	N
F081	13	0	N	N	N	N
F082	10	0	N	N	S	N
F083	12	0	N	S	N	N
F084	10	0	N	N	N	N
F085	10	0	N	N	N	N
F086	12	0	N	N	N	N
F087	54	0	N	N	N	N
F088	11	0	N	N	N	N
F089	11	0	N	N	N	S
F090	10	0	N	N	N	N
F091	38	0	N	N	S	N
F092	12	0	N	N	S	S
F093	11	0	N	S	N	N
F094	12	0	N	N	N	N
F095	10	0	N	N	S	N
F096	12	0	N	N	N	N
F097	9	0	N	N	N	S
F098	10	0	N	N	N	N
F099	10	0	N	N	S	N
F100	8	0	N	N	N	N
F101	10	0	N	N	N	N
F102	8	0	s	N	S	N
F103	10	0	N	N	S	S
F104	8	0	N	N	S	S

Código	anti-CCP	FR-IgM	Doença cardiovascular	Aborto	Tabagismo	Sintoma articular
F105	10	0	N	N	S	N
F106	8	0	N	N	N	N
F107	9	0	N	N	S	N
F108	8	0	N	N	N	N
F109	9	0	N	N	S	N
F110	9	0	N	N	N	N
F111	9	0	N	N	S	N
F112	8	0	N	N	S	N
F113	9	0	N	S	N	N
F114	9	0	N	N	S	N
F115	9	0	N	N	N	N
F116	8	0	N	N	N	S
F118	12	0	N	N	N	N
F119	8	0	N	S	N	N
F120	9	0	N	N	N	N
F121	10	0	N	N	N	N
F122	10	0	N	N	N	S
F123	10	0	N	N	S	N
F124	7	0	N	N	S	N
F127	8	0	s	N	S	S
F128	12	0	N	N	S	N
F129	9	0	N	N	S	S
F130	13	0	N	N	S	S
F131	11	30	N	N	N	N
F132	10	0	N	N	N	N
F133	7	0	s	S	N	N
F134	9	30	N	N	N	S
F135	10	30	N	S	N	N
F136	8	0	N	N	S	N
F137	8	0	N	S	N	N
F138	9	0	N	S	S	S
F139	8	0	N	N	N	S
F140	8	0	N	N	N	N
F141	215	1280	N	N	S	N
F142	9	0	N	N	N	N
F143	8	0	N	N	N	S
F144	7	0	N	N	S	N
F145	7	0	N	S	N	N
F146	13	0	N	N	S	N
F147	10	0	N	S	N	N
F148	14	0	N	N	S	N
F149	11	0	N	N	N	S
F150	16	0	N	N	N	N
F151	9	0	N	N	N	N
F152	7	0	N	N	N	N
F153	7	30	N	S	N	N
F155	7	0	N	N	S	N
F156	12	0	N	N	S	S
F157	8	0	N	N	S	N
F158	13	0	N	N	S	N
F159	8	30	N	N	N	S
F160	9	0	N	N	N	N

Código	anti-CCP	FR-IgM	Doença cardiovascular	Aborto	Tabagismo	Sintoma articular
F161	7	0	N	N	N	S
F162	7	0	N	N	N	S
F163	9	0	N	N	N	N
F164	12	0	N	N	N	S
F165	11	0	N	N	N	N
F166	13	40	N	N	N	N
F167	8	0	N	N	S	S
F168	9	0	N	N	N	S
F169	7	0	N	N	N	N
F170	7	0	N	N	N	N
F171	9	0	N	N	S	N
F172	8	30	N	S	N	N
F173	8	0	N	N	N	N
F174	7	0	N	N	N	N
F175	11	0	N	N	N	N
F176	8	0	N	S	N	S
F177	8	0	N	N	N	N
F178	8	0	N	N	N	N
F179	14	0	N	N	N	N
F180	10	0	N	N	S	N
F181	8	0	N	N	N	N
F182	8	0	N	N	N	N
F184	8	0	N	N	N	N
F186	19	0	N	N	N	N
F188	234	80	N	N	N	N
F189	7	0	N	S	N	S
F190	11	0	N	N	N	N
F191	7	0	N	S	N	S
F192	16	0	N	N	N	S
F193	148	0	N	N	N	S
F194	10	0	N	N	N	N
F195	12	0	N	N	S	N
F196	10	0	N	N	N	S
F197	9	0	N	N	N	N
F198	10	0	N	N	S	N
F199	9	0	N	N	S	N
F200	7	0	N	N	N	N
F201	9	0	N	N	N	N
F202	10	0	N	N	N	N
F203	10	0	N	N	N	S
F204	10	0	N	N	N	N
F205	9	0	N	N	N	N
F206	8	0	N	N	N	N
F207	9	0	N	N	N	N
F208	8	0	N	N	N	S
F209	18	0	N	N	N	N

NOTA: Anti-CCP positivo =  $\geq 20$  U/ml; FR-IgM positivo =  $\geq 30$  U/ml.

## APÊNDICE 7 - DADOS DEMOGRÁFICOS E DE MBL DO GRUPO CONTROLE

<b>Código</b>	<b>Gênero</b>	<b>Idade</b>	<b>Etnia</b>	<b>[MBL] ng/ml</b>	<b>Genótipos <i>MBL2</i></b>	
020	1	78	1	ND	LYPB	LYQA
251	2	39	2	ND	HYPD	LYQA
255	2	31	2	ND	LYPA	LYQA
295	2	37	2	ND	LXPA	LXPA
304	1	46	1	ND	HYPB	LYPB
309	2	28	2	ND	HYPB	HYPD
317	2	38	2	ND	LYPB	LYQA
1022	2	52	1	ND	HYPB	LYQA
1044	2	30	1	ND	LYPB	LXPA
1046	2	33	1	ND	HYPB	LXPA
1102	2	46	2	ND	HYPB	LYQC
1110	2	40	1	ND	HYPB	LYQA
1128	2	34	1	ND	LYPB	LXPA
1148	2	37	2	ND	LYPA	LXPA
1198	2	53	1	ND	LXPA	LXPA
1204	2	31	1	ND	HYPB	LXPA
1214	2	29	1	ND	LYPB	LYPA
1236	2	28	1	ND	LYPB	LYQC
1246	2	42	1	ND	HYPB	LYQA
1256	2	40	1	ND	LXPA	LXPA
1258	2	37	2	ND	HYPB	LYQA
1262	2	29	1	ND	LYPB	LXPA
1270	2	48	1	ND	HYPB	HYPB
014 MSS	2	62	1	ND	HYPB	LYQA
016 MRT	2	54	1	ND	LXPA	LYQA
019 NAC	2	40	2	ND	LYPA	LYQA
020 SRV	2	28	2	ND	LYPB	LYPB
021 OCR	2	36	1	ND	HYPB	HYPD
023 IMR	2	55	1	ND	LYPA	LXPA
033 G	2	32	2	ND	HYPB	LYQA
035 G	2	36	2	ND	HYPB	LYPB
037 VSG	2	45	1	ND	LYQA	LYQA
047 WPB	2	31	1	ND	LYPB	LXPA
048 MPO	2	56	2	ND	LYPB	LYQA
050 IBG	2	48	1	ND	LYPB	LXPA
051 LAS	1	60	2	ND	HYPB	LYQA
052 VLS	2	53	1	ND	HYPD	LXPA
054 JVP	2	45	1	ND	LYQA	LYQA
060	2	59	1	ND	HYPB	LYQA
065	2	45	1	ND	HYPB	LYQA
069	2	34	2	ND	HYPB	LYPB
074 CER	2	27	1	ND	HYPB	LXPA
076 MDS	2	39	1	ND	LXPA	LXPA
077 SPR	2	50	1	ND	LXPA	LXPA
078 MMS	2	39	2	ND	HYPB	LYPB
085 CFR	2	60	1	ND	LYPB	LXPA
086 APR	2	31	1	ND	HYPB	LXPA
141 G	2	56	2	ND	HYPB	HYPB
195 G	2	45	2	ND	HYPB	HYPB
BS003	2	36	2	ND	HYPB	LYQA
BS006	2	46	1	ND	HYPB	LXPA
BS009	2	41	1	ND	LYPB	LXPA
BS012	2	27	2	ND	LYPA	LYQC

<b>Código</b>	<b>Gênero</b>	<b>Idade</b>	<b>Etnia</b>	<b>[MBL] ng/ml</b>	<b>Genótipos <i>MBL2</i></b>	
BS015	2	35	2	ND	HYPB	LYPB
BS025	2	54	1	ND	LYPB	LYPB
BS026	2	28	2	ND	HYPB	LYPB
BS029	2	52	2	ND	LYQA	LYQC
BS031	2	52	1	ND	HYPB	LXPB
BS035	2	43	1	ND	LYPB	LYPB
BS037	2	33	1	ND	LYPB	LYPB
BS038	1	57	1	ND	HYPB	LYQA
BS046	2	53	1	ND	HYPB	LYQA
BS052	2	46	1	ND	LYPB	LXPB
BS060	2	51	1	ND	LYQA	LYQA
BS066	2	43	3	ND	HYPB	LYPB
BS075	2	45	3	ND	HYPB	LYQA
BS076	1	57	1	ND	LYPB	LYQA
BS078	2	61	1	ND	LYQA	LYQA
BS082	2	46	1	ND	LYPB	LYQA
BS084	2	33	1	ND	LYQA	LYPB
BS087	2	30	1	ND	LYPB	LXPB
BS088	2	36	2	ND	LYQA	LYQA
BS091	2	56	1	ND	LYPB	LXPB
BS092	1	61	1	ND	HYPB	LXPB
BS096	2	49	1	ND	HYPB	LXPB
BS103	2	28	1	ND	LYQA	LYQC
BS104	2	56	1	ND	HYPB	LXPB
BS105	2	38	1	ND	LYQA	LYQA
BS115	2	27	2	ND	HYPB	LYQA
BS121	2	52	2	ND	HYPD	LXPB
BS124	2	35	1	ND	HYPB	LYQA
BS129	2	39	1	ND	HYPB	LYPB
BS134	2	52	1	ND	HYPB	LYPB
BS140	2	33	2	ND	LYQA	LYQA
BS142	2	47	1	ND	HYPB	LXPB
BS145	2	32	1	ND	LYQA	LYQC
BS147	2	35	1	ND	LYQA	LYQA
BS155	2	33	2	ND	LYPB	LYPB
BS158	2	31	1	ND	LYPB	LXPB
BS161	2	29	1	ND	HYPB	LXPB
BS163	2	46	1	ND	HYPB	HYPD
BS164	2	35	1	ND	LYPB	LYPB
BS166	2	37	1	ND	LYQA	LXPB
BS175	2	48	1	ND	HYPB	HYPB
BS179	2	28	1	ND	LYPB	LYQA
BS181	2	42	1	ND	LYQA	LYQA
BS182	2	57	1	ND	HYPB	HYPB
BS183	2	42	1	ND	HYPB	HYPD
BS184	2	29	2	ND	LYQA	LYQA
BS185	2	37	2	ND	HYPB	LYQA
BS186	2	39	1	ND	HYPB	HYPB
BS187	2	42	1	ND	HYPB	LYQA
BS188	2	34	1	ND	HYPB	HYPD
BS189	2	28	2	ND	HYPB	LYQA
BS190	2	36	1	ND	HYPB	LYPB
BS191	2	39	2	ND	LXPB	LYQA
BS197	2	46	2	ND	HYPB	HYPB
BS200	2	34	1	ND	LYQA	LYQA

<b>Código</b>	<b>Gênero</b>	<b>Idade</b>	<b>Etnia</b>	<b>[MBL] ng/ml</b>	<b>Genótipos <i>MBL2</i></b>	
BS201	2	35	1	ND	LYPB	LYPB
BS202	2	43	1	ND	HYPB	HYPD
BS203	2	46	1	ND	LYQA	LYQA
BS205	2	42	2	ND	LXPA	LXPA
BS206	2	26	1	ND	LXPA	LXPA
BS207	2	35	2	ND	LYQA	LYQC
BS208	2	38	1	ND	LYPB	LYQA
BS209	2	39	1	ND	HYPB	LYQA
BS210	2	50	1	ND	HYPB	LXPA
BS211	2	47	1	ND	HYPB	LYQA
BS212	2	52	1	ND	HYPB	LXPA
BS217	2	43	1	ND	HYPB	LXPA
BS221	2	49	2	ND	LYPB	LYQA
BS223	2	33	1	ND	LYPA	LXPA
BS225	2	26	2	ND	HYPB	LYPB
BS226	1	57	1	ND	HYPB	LXPA
BS227	2	48	1	ND	LXPA	LYQA
BS231	2	28	1	ND	LYPB	LYQA
BS233	2	49	1	ND	HYPB	LYPB
BS239	2	50	1	ND	HYPB	LYQA
BS240	2	48	1	ND	HYPB	LYPA
BS241	2	31	1	ND	HYPD	LYPA
BS243	2	47	1	ND	HYPB	LXPA
BS244	1	56	1	ND	HYPB	HYPB
BS246	2	44	1	ND	LYPB	LYQC
BS251	2	32	1	ND	HYPB	LXPA
BS254	2	37	1	ND	HYPD	LXPA
BS255	2	26	1	ND	HYPB	LXPA
D062	2	43	1	ND	HYPB	LYQA
D072	2	35	1	ND	HYPB	HYPB
D073	2	39	1	ND	LYQA	LYQA
D127	2	56	1	ND	LXPA	LXPA
D129	2	35	2	ND	LYQA	LYQA
D141	2	56	2	ND	HYPB	HYPB
D160	2	44	2	ND	LYPA	LXPA
D170	1	70	1	ND	HYPB	LXPA
D185	1	64	1	ND	LXPA	LYQA
D194	1	62	1	ND	LXPA	LYQA
D195	1	58	1	ND	HYPB	LYQA
D198	1	59	1	ND	LYPA	LYPD
D201	1	71	1	ND	LYQA	LYQA
D202	1	69	1	ND	HYPB	LYQA
D206	1	60	1	ND	LXPA	LXPA
D212	1	61	1	ND	HYPB	LYPA
D214	1	65	1	ND	HYPB	LXPA
D220	1	63	1	ND	HYPD	LXPA
D252	1	58	1	ND	HYPB	LYPB
D253	1	62	1	ND	HYPB	HYPB
D256	1	62	1	ND	LYPB	LXPA
D263	1	60	1	ND	LXPA	LXPA
D264	1	58	1	ND	LXPA	LYQA
D270	1	65	1	ND	HYPB	LYQA
WIT 004	1	52	1	ND	HYPD	LXPA
WIT 006	1	55	1	ND	HYPB	LYPB
WIT 007	1	74	1	ND	HYPB	LYPA



<b>Código</b>	<b>Gênero</b>	<b>Idade</b>	<b>Etnia</b>	<b>[MBL] ng/ml</b>	<b>Genótipos <i>MBL2</i></b>	
WIT 018	1	77	1	ND	LXPA	LXPA
WIT 019	2	33	1	ND	LYPA	LYPB
WIT 027	1	74	1	ND	HYP A	LYPA
WIT 029	2	42	1	ND	HYP A	LXPA
WIT 032	1	65	1	ND	HYP A	HYP A
WIT 035	2	53	1	ND	HYP A	LYPB
WIT 040	1	51	1	ND	LYPA	LXPA
WIT 042	2	52	1	ND	HYP A	LYPA
WIT 044	1	53	1	ND	HYP A	HYPD
WIT 045	2	28	1	ND	HYPD	LYPD
WIT 049	2	29	1	ND	HYPD	LYPB
WIT 069	2	46	1	ND	HYP A	HYP A
WIT 071	2	61	1	ND	LXPA	LXPA
WIT 074	2	39	1	ND	HYP A	LYPB
WIT 146	2	89	1	ND	HYPD	LXPA
WIT 154	2	50	1	ND	HYP A	LYQC
WIT 155	2	47	1	ND	LXPA	LYQA
WIT 165	2	53	1	ND	HYP A	LXPA
WIT 167	2	54	1	ND	HYP A	HYP A
WIT 174	1	57	1	ND	HYPD	HYPD
WIT 176	2	70	1	ND	HYP A	LYPB
WIT 179	2	51	1	ND	HYP A	LYPA
WIT 183	2	59	1	ND	HYP A	LXPA
WIT 184	2	56	1	ND	HYPD	LYQA
WIT 190	2	55	1	ND	LXPA	LYQA
WIT 191	1	71	1	ND	HYP A	LYQA
WIT 196	2	55	1	ND	HYP A	LYQA
WIT 199	1	59	1	ND	LYPB	LYPA
WIT 200	2	55	1	ND	HYP A	LYQA
WIT 204	1	84	1	ND	HYPD	LXPA
WIT 215	2	51	1	ND	LXPA	LYQA
WIT 226	2	52	1	ND	LYPA	LXPA
WIT 230	2	86	1	ND	HYP A	HYP A
WIT 243	1	77	1	ND	HYPD	LYQA
WIT 248	1	63	1	ND	LYPA	LYQA
WIT 252	2	65	1	ND	HYP A	HYPD
WIT 253	1	71	1	ND	LYQA	LYQA
002 RK	2	26	1	100	ND	ND
004 RR	2	38	1	1149	ND	ND
005 TK	2	40	1	1459	ND	ND
006 RFP	2	23	1	2475	ND	ND
007 RS	2	30	1	2388	ND	ND
008 RW	2	31	1	3409	ND	ND
009 LPE	2	39	1	1883	ND	ND
010 VM	1	32	1	100	ND	ND
011 SEM	2	33	1	395	ND	ND
012 CN	1	54	1	1802	ND	ND
014 JHE	1	47	1	2640	ND	ND
016 CNK	2	27	1	311	ND	ND
019 LMM	2	28	1	2155	ND	ND
020 AS	2	27	1	745	ND	ND
021 VG	2	24	1	1207	ND	ND
023 TMSF	2	26	1	3587	ND	ND
024 OS	2	26	1	939	ND	ND
025 LPE	2	33	1	1394	ND	ND

<b>Código</b>	<b>Gênero</b>	<b>Idade</b>	<b>Etnia</b>	<b>[MBL] ng/ml</b>	<b>Genótipos <i>MBL2</i></b>	
026 TP	2	51	1	943	ND	ND
027 DLN	2	56	1	1994	ND	ND
029 AFM	2	30	1	3855	ND	ND
030 SMV	1	25	1	1467	ND	ND
031 MGG	2	42	1	2112	ND	ND
032 CK	2	34	1	2966	ND	ND
035 RTSG	2	37	1	2404	ND	ND
037 EOC	2	26	1	2787	ND	ND
039 MG	2	30	1	100	ND	ND
040 MMS	2	29	1	3214	ND	ND
041 GPFB	2	36	1	2246	ND	ND
042 ALV	2	28	1	1295	ND	ND
043 AS	2	28	1	1332	ND	ND
044 LO	2	31	1	2737	ND	ND
045 SBIA	2	32	1	1099	ND	ND
046 CS	2	26	1	100	ND	ND
047CAMA	1	36	1	100	ND	ND
048 MIM	1	29	1	2112	ND	ND
049 RIIC	2	41	1	1720	ND	ND
050 STH	2	45	1	100	ND	ND
051 CTK	2	40	1	695	ND	ND
052 OOJ	1	44	1	784	ND	ND
053 IASN	2	34	1	3427	ND	ND
054 KRM	2	24	1	4321	ND	ND
056 MV	2	24	1	2030	ND	ND
065 AFC	2	56	1	2059	ND	ND
066 ASAS	2	64	1	2359	ND	ND
067 JC	2	65	1	932	ND	ND
068 AMG	2	71	1	100	ND	ND
069 BLS	1	70	1	100	ND	ND
101KC	1	37	1	100	ND	ND
017/117	2	45	1	3045	ND	ND
019/119	1	51	1	1049	ND	ND
002/102	2	42	1	574	ND	ND
020/120	2	78	1	755	ND	ND
022/122	2	41	1	3642	ND	ND
026/126	2	61	1	1010	ND	ND
027/127	2	41	1	100	ND	ND
028/128	2	63	1	984	ND	ND
033/133	2	49	1	931	ND	ND
034/134	2	50	1	1114	ND	ND
037/137	2	55	1	100	ND	ND
039/139	2	50	1	909	ND	ND
040/140	2	51	1	1926	ND	ND
042/142	2	68	1	2806	ND	ND
044/144	2	60	1	1236	ND	ND
046/146	2	40	1	1049	ND	ND
050/150	2	49	1	2544	ND	ND
051/151	2	40	1	1833	ND	ND
054/154	2	52	1	3331	ND	ND
055/155	2	51	1	929	ND	ND
059/159	2	59	1	1747	ND	ND
007/107	1	70	1	1919	ND	ND
008/108	1	51	1	992	ND	ND
001V PFS	2	72	1	285	ND	ND

<b>Código</b>	<b>Gênero</b>	<b>Idade</b>	<b>Etnia</b>	<b>[MBL] ng/ml</b>	<b>Genótipos <i>MBL2</i></b>	
002V IL	2	52	1	140	ND	ND
003V JFO	1	61	1	300	ND	ND
004V LMRP	2	54	1	280	ND	ND
006V NSG	2	53	1	3726	ND	ND
007V RASP	2	80	1	634	ND	ND
008V ESB	2	56	1	250	ND	ND
009V JLS	1	70	1	100	ND	ND
010V ETC	2	69	1	100	ND	ND
011V CMA	2	58	1	100	ND	ND
012V EG	2	81	1	100	ND	ND
013V LW	1	69	1	460	ND	ND
014V MVO	2	61	1	899	ND	ND
015V RG	1	73	1	1036	ND	ND
016V JNS	2	62	1	100	ND	ND
017V RAM	2	78	1	126	ND	ND
014 MSS	2	60	1	100	ND	ND
048 MPO	2	53	3	100	ND	ND
016 MRT	2	51	1	100	ND	ND
037 VSG	2	50	1	100	ND	ND
065 JTM	2	50	1	100	ND	ND
126 ZMA	2	55	2	100	ND	ND
127 EBS	2	51	1	495	ND	ND
128 DVF	2	57	1	100	ND	ND
129 RNN	2	61	1	100	ND	ND
130 JSM	2	59	1	100	ND	ND
002	2	42	1	280	ND	ND
003	2	34	1	3500	ND	ND
004	2	19	1	500	ND	ND
005	1	29	1	3500	ND	ND
006	1	52	2	3600	ND	ND
007	1	70	1	1400	ND	ND
008	1	51	1	480	ND	ND
009	1	54	2	4500	ND	ND
010	1	26	1	250	ND	ND
011	1	20	1	550	ND	ND
012	1	75	2	350	ND	ND
013	1	41	2	4500	ND	ND
014	1	33	1	100	ND	ND
015	1	37	1	3100	ND	ND
016	1	29	1	4000	ND	ND
017	2	45	1	3500	ND	ND
018	1	31	1	2000	ND	ND
019	1	51	1	800	ND	ND
020	2	78	1	400	ND	ND
021	2	25	1	3500	ND	ND
022	2	41	1	4200	ND	ND
026	2	61	1	640	ND	ND
027	2	41	1	100	ND	ND
028	2	63	1	600	ND	ND
029	2	57	2	2050	ND	ND
030	2	57	3	2100	ND	ND
031	2	45	2	100	ND	ND
032	2	52	2	100	ND	ND
033	2	49	1	1100	ND	ND
034	2	50	1	980	ND	ND

<b>Código</b>	<b>Gênero</b>	<b>Idade</b>	<b>Etnia</b>	<b>[MBL] ng/ml</b>	<b>Genótipos <i>MBL2</i></b>	
037	2	55	1	100	ND	ND
038	2	48	2	2100	ND	ND
039	2	50	1	400	ND	ND
040	2	51	1	2600	ND	ND
041	2	64	1	1700	ND	ND
042	2	68	1	2500	ND	ND
043	2	26	1	1700	ND	ND
044	2	60	1	370	ND	ND
045	2	56	2	450	ND	ND
046	2	40	1	650	ND	ND
047	2	56	2	1500	ND	ND
048	2	39	1	1400	ND	ND
049	2	28	1	370	ND	ND
050	2	49	1	2800	ND	ND
051	2	40	1	1800	ND	ND
052	2	37	1	2500	ND	ND
053	2	31	1	1200	ND	ND
054	2	52	1	3200	ND	ND
055	2	51	1	400	ND	ND
056	2	36	1	100	ND	ND
057	2	41	4	450	ND	ND
058	2	38	4	600	ND	ND
059	2	59	1	2500	ND	ND
060	2	52	1	1800	ND	ND
064	2	38	1	100	ND	ND
065	2	59	1	1900	ND	ND

NOTA: MBL:  $\leq 100$  ng/ml = baixa; 100 - 1000 ng/ml = intermediária;  $\geq 1000$  ng/ml = alta.

## APÊNDICE 8 - DADOS DEMOGRÁFICOS E DE MASP-2 DO GRUPO CONTROLE

<b>Código</b>	<b>Gênero</b>	<b>Idade</b>	<b>Etnia</b>	<b>[MASP-2] ng/ml</b>	<b>Genótipos <i>MASP2</i></b>	
1022	2	52	1	ND	*2B2A-i	*1C2-l
1044	2	30	1	ND	*2B2A-i	*2B2A-i
1046	2	33	1	ND	*2B2A-i	*2B2A-i
1068	2	28	1	ND	*2B2A-i	*1B1-h
1082	2	28	1	ND	*2B2A-i	*1B1-h
1104	2	27	1	ND	*2B2A-i	*2B2A-i
1108	2	28	1	ND	*2B2A-i	*2B1-i
1110	2	40	1	ND	*2A2-l	*1A
1128	2	34	1	ND	*2B2A-i	*2B1-i
1198	2	53	1	ND	*2B2A-i	*1B1-h
1204	2	31	1	ND	*2B2A-i	*2B2A-i
1214	2	29	1	ND	*2B2A-i	*1B1-h
1228	2	27	1	ND	*2B2A-i	*1B1-h
1236	2	28	1	ND	*1A	*1A
1246	2	42	1	ND	*2B2A-i	*2B2A-i
1256	2	40	1	ND	*2B2A-i	*2B2A-i
1260	2	36	1	ND	*2B2A-i	*2B2A-i
1262	2	29	1	ND	*2A2-l	*2B1-i
1270	2	48	1	ND	*2B2A-i	*1B1-h
001 MIN	2	42	1	ND	*2B2A-i	*2B2A-i
008 GML	2	31	1	ND	*2B2A-i	*2B2A-i
010 JLP	2	31	1	ND	*2B2A-i	*1B1-h
011 KSP	2	32	1	ND	*1B1-h	*1B1-h
012 LLG	2	34	1	ND	*1C1-l	*2A2-l
014 MSS	2	62	1	ND	*2B2A-i	*1A
015 MNL	2	33	1	ND	*2B2A-i	*2B2A-i
016 MRT	2	54	1	ND	*2B2A-i	*2B1-i
019 NAC	2	40	2	204	*2B2A-i	*1B1-h
020 SRV	2	28	2	ND	*2B2A-i	*2B1-i
021 OCR	2	36	1	ND	*2B2A-i	*1B1-h
023 IMR	2	55	1	ND	*2B2A-i	*1B1-h
034 DDD	2	35	1	ND	*2B2A-i	*2B2B-l
037 VSG	2	45	1	ND	*2B2A-i	*2B2A-i
043 MBX	2	50	1	ND	*2A2-l	*1B1-h
047 WPB	2	31	1	ND	*2B2A-i	*2B2A-i
048 MPO	2	56	2	ND	*2B2A-i	*2B1-i
050 IBG	2	48	1	ND	*2B2A-i	*1B1-h
051 LAS	1	60	2	ND	*2B2A-i	*2B2B-l
052	2	45	1	792	*2B2A-i	*1B2-h
052 VLS	2	53	1	ND	*2B2A-i	*1B2-h
054 JVP	2	45	1	ND	*1B1-h	*1B1-h
058 MBO	2	27	1	ND	*2B2A-i	*2B1-i
061	2	27	2	208	*2B2A-i	*1B1-h
065	2	45	1	148	2B2A-i	2B1-i
074 CER	2	27	1	ND	*2B2A-i	*1A
076 MDS	2	39	1	ND	*2B2A-i	*2B1-i
077	2	44	1	179	*2B2A-i	*1B1-h
077 SPR	2	50	1	ND	*2B2A-i	*1B1-h
078 MMS	2	39	2	347	*2B2A-i	*2B1-i
079 KCFL	2	27	1	ND	*2B2A-i	*2B2A-i
085 CFR	2	60	1	ND	*2B2A-i	*1A
086 APR	2	31	1	ND	*1A	*2B1-i
128 DVF	2	55	1	ND	*2B2A-i	*2B2A-i

Código	Gênero	Idade	Etnia	[MASP-2] ng/ml	Genótipos <i>MASP2</i>	
129 RNN	2	51	1	ND	*2B2A-i	*2B2A-i
130 JSM	2	57	1	237	*2B2A-i	*1A
132 MHH	2	75	1	165	*2B2A-i	*2B2A-i
133 ISS	2	70	1	471	*2B2A-i	*1A
135 TOO	2	70	1	ND	*2B2A-i	*2B2A-i
BS002	2	34	1	ND	*2B2A-i	*2B1-i
BS003	2	36	2	212	*2B2A-i	*2B2A-i
BS006	2	46	1	179	*2B2A-i	*2B2A-i
BS009	2	41	1	ND	*2B2A-i	*2B2A-i
BS012	2	27	2	ND	*2B2A-i	*2B2A-i
BS015	2	35	2	824	*2B2A-i	*1B1-h
BS019	2	31	1	ND	*2B2A-i	*2B2A-i
BS025	2	54	1	430	*2B2A-i	*1B1-h
BS026	2	28	2	669	*2B2A-i	*2B2A-i
BS029	2	52	2	610	*2B2A-i	*2B2A-i
BS031	2	52	1	581	*2B2A-i	*2B2A-i
BS035	2	43	1	610	*2B2A-i	*2B2A-i
BS037	2	33	1	ND	*2B2A-i	*2A2-l
BS038	1	57	1	117	*2B2A-i	*2B1-i
BS043	2	32	1	ND	*2B2A-i	*2B2A-i
BS046	2	53	1	250	*2B2A-i	*2B2A-i
BS052	2	46	1	278	*2B2A-i	*1A
BS060	2	51	1	203	*2B2A-i	*2B2A-i
BS061	2	46	1	278	*2B2A-i	*2A2-l
BS065	2	51	1	289	*2B2A-i	*2B2A-i
BS066	2	43	3	635	*2B2A-i	*2B2A-i
BS068	2	37	1	228	*2B2A-i	*2B2A-i
BS071	2	42	1	800	*1A	*1B1-h
BS075	2	45	3	ND	*2B2A-i	*1B1-h
BS076	1	57	1	217	*2B2A-i	*1B1-h
BS078	2	61	1	274	*2B2A-i	*2B1-i
BS080	2	46	3	ND	*2B2A-i	*2B2A-i
BS082	2	46	1	207	*2B2A-i	*2B2A-i
BS083	2	42	1	353	*2B2A-i	*2B2A-i
BS084	2	33	1	ND	*2B2A-i	*1B1-h
BS087	2	30	1	ND	*2B2A-i	*2B2A-i
BS088	2	36	2	145	*2A2-l	*1B1-h
BS091	2	56	1	405	*2B2A-i	*2B1-i
BS092	1	61	1	255	*2B2A-i	*2B2A-i
BS096	2	49	1	190	*2B2A-i	*2B2A-i
BS103	2	28	1	ND	*2B2A-i	*2B2A-i
BS104	2	56	1	324	*2B2A-i	*2B2A-i
BS105	2	38	1	ND	*2B2A-i	*2B2A-i
BS114	1	55	1	239	*2B2A-i	*1A
BS115	2	27	2	ND	*2A2-l	*1A
BS121	2	52	2	647	*2A2-l	*1B2-h
BS124	2	35	1	ND	*2B2A-i	*2B2A-i
BS129	2	39	1	ND	*2A2-l	*1B1-h
BS131	2	26	1	ND	*1B1-h	*1B1-h
BS132	2	28	1	ND	*2B2A-i	*2B2A-i
BS134	2	52	1	301	*2B2A-i	*2B2A-i
BS140	2	33	2	713	*2B2A-i	*2B2A-i
BS142	2	47	1	986	*1B1-h	*1B1-h
BS145	2	32	1	ND	*1A	*1B1-h
BS147	2	35	1	ND	*2B2A-i	*2B2A-i

Código	Gênero	Idade	Etnia	[MASP-2] ng/ml	Genótipos <i>MASP2</i>	
BS151	2	39	1	ND	*2B2A-i	*2B1-i
BS155	2	33	2	997	*2B2A-i	*2A1
BS158	2	31	1	ND	*2B2A-i	*2B2A-i
BS161	2	29	1	ND	*2B2A-i	*2B2A-i
BS163	2	46	1	570	*2B2A-i	*2B2A-i
BS164	2	35	1	ND	*2B2A-i	*1B1-h
BS166	2	37	1	193	*2B2A-i	*2B2A-i
BS167	2	44	1	ND	2B2A-i	2B2A-i
BS175	2	48	1	280	*2B2A-i	*2B2A-i
BS177	2	55	1	275	*2B2A-i	*2B1-i
BS179	2	28	1	ND	*2B1-i	*1B1-h
BS180	2	24	1	160	*2B2A-i	*2B2A-i
BS181	2	42	1	ND	*2A2-l	*1A
BS182	2	57	1	62	*2B2A-i	*2A2-l
BS183	2	42	1	ND	*2B2A-i	*2B2A-i
BS184	2	29	2	126	*1C2-l	*1C2-l
BS185	2	37	2	105	*2B2A-i	*2A2-l
BS186	2	39	1	ND	*2B2A-i	*2A2-l
BS187	2	42	1	561	*2B2A-i	*2B2A-i
BS188	2	34	1	ND	*2B2A-i	*1B1-h
BS189	2	28	2	438	*2B2A-i	*2A2-l
BS190	2	36	1	ND	*2B2A-i	*2B2A-i
BS191	2	39	2	190	*2B2A-i	*1A
BS192	2	41	2	622	*2B2A-i	*2B2A-i
BS197	2	46	2	278	*2B2A-i	*2B2A-i
BS199	2	37	1	ND	*2B2A-i	*1B1-h
BS200	2	34	1	ND	*2B2A-i	*2B2A-i
BS201	2	35	1	ND	*2B2A-i	*1B1-h
BS202	2	43	1	589	*2B2A-i	*2B2A-i
BS203	2	46	1	ND	*2B2A-i	*2B2A-i
BS205	2	42	2	631	*2B2A-i	*1B1-h
BS206	2	26	1	ND	*2B2A-i	*1B2-h
BS207	2	35	2	653	*2B2A-i	*2B1-i
BS208	2	38	1	ND	*2B2A-i	*2B2A-i
BS209	2	39	1	391	*2B2A-i	*2B2A-i
BS210	2	50	1	403	*2B2A-i	*1B1-h
BS211	2	47	1	178	*2B2A-i	*2B2A-i
BS212	2	52	1	477	*2B2A-i	*1B1-h
BS217	2	43	1	ND	2B2A-i	1B1-h
BS221	2	49	2	390	*2A2-l	*1B1-h
BS223	2	33	1	ND	*2B2A-i	*2B2A-i
BS224	2	35	1	ND	*2B2A-i	*2B2A-i
BS225	2	26	2	ND	*2B2A-i	*2B2A-i
BS226	1	57	1	254	*2B2A-i	*1B1-h
BS227	2	48	1	329	*2B2A-i	*2B2A-i
BS228	2	40	1	ND	*2B2B-l	*1B1-h
BS231	2	28	1	ND	*2B2A-i	*1C1-l
BS233	2	49	1	261	*2B2A-i	*1B1-h
BS237	2	32	1	ND	*2B2A-i	*2B2A-i
BS239	2	50	1	194	*2B2A-i	*2B2A-i
BS240	2	48	1	385	*2B2A-i.1B1-h	*1B1-h
BS241	2	31	1	ND	*2B2A-i	*2B2A-i
BS243	2	47	1	122	*2B2A-i	*2B2B-l
BS244	1	56	1	158	*2B2A-i	*2A2-l
BS246	2	44	1	370	*2B2A-i	*1B1-h

Código	Gênero	Idade	Etnia	[MASP-2] ng/ml	Genótipos <i>MASP2</i>	
BS249	2	29	3	847	*2B2A-i	*2B2A-i
BS251	2	32	1	ND	*2B2A-i	*2B2A-i
BS254	2	37	1	ND	*2B2A-i	*2B2A-i
BS255	2	26	1	ND	*2B2A-i	*2B2A-i
C129	2	40	1	605	2B2A-i	2B2A-i
D062	2	43	1	ND	*1C1-l	*1B1-h
D072	2	35	1	ND	*2B2A-i	*1B1-h
D073	2	39	1	ND	*2B2A-i	*1A
D105	1	63	1	ND	*1C1-l	*1B1-h
D122	2	32	1	ND	*2B2A-i	*2B2B-l
D127	2	56	1	135	*2B2A-i	*2B2A-i
D133	1	62	1	ND	*2B2A-i	*2B2A-i
D157	1	69	1	ND	*2B2A-i	*2B2A-i
D160	2	44	2	ND	*1B1-h	*1B1-h
D170	1	70	1	ND	*2B2A-i	*1B1-h
D179	1	63	1	ND	*2B2A-i	*1B2-h
D185	1	64	1	ND	*2B2A-i	*2B2A-i
D194	1	62	1	ND	*2B1-i	*1B1-h
D195	1	58	1	ND	*2B2A-i	*2B2A-i
D198	1	59	1	ND	*2B2A-i	*1A
D201	1	71	1	ND	*1C1-l	*1A
D202	1	69	1	ND	*2B1-i	*1B1-h
D206	1	60	1	ND	*2B2A-i	*2B2A-i
D212	1	61	1	ND	*2B2A-i	*2B2A-i
D214	1	65	1	ND	*2B2A-i	*2A2-l
D220	1	63	1	ND	*2B2A-i	*1B1-h
D249	1	63	1	ND	*2B2A-i	*2B2A-i
D252	1	58	1	ND	*2B2A-i	*2A2-l
D253	1	62	1	ND	*2B2A-i	*1B1-h
D256	1	62	1	ND	*2B2A-i	*2B2A-i
D263	1	60	1	ND	*2B2A-i	*1B1-h
D264	1	58	1	ND	*1B1-h	*1B1-h
D265	1	58	1	ND	*2B2B-l	*1A
D270	1	65	1	ND	*2B2A-i	*2B2A-i
D28	2	45	1	ND	*2B2A-i	*2B2A-i
D32	2	34	1	ND	*1C1-l	*2A2-l
D35	1	66	1	ND	*2B2A-i	*2B1-i
D60	2	27	1	ND	*2A2-l	*2B1-i
D61	2	64	1	ND	*2B2A-i	*2B2A-i
D76	2	36	1	ND	*2B2A-i	*1A
WIT 146	2	89	1	638	*2B2A-i	*1B1-h
WIT 149	2	51	1	608	*2B2A-i	*2B2A-i
WIT 153	2	72	1	796	*2B2A-i	*2B2A-i
WIT 154	2	50	1	388	*2B2A-i	*2B2A-i
WIT 155	2	47	1	643	*2B2A-i	*2B2A-i
WIT 165	2	53	1	340	*2B2A-i	*2B2A-i
WIT 167	2	54	1	714	*2B2A-i	*1B1-h
WIT 174	1	57	1	990	*2B1-i	*2A1
WIT 176	2	70	1	1200	*2B2A-i	*2B2A-i
WIT 179	2	51	1	187	*2B2A-i	*2B2A-i
WIT 183	2	59	1	662	*1A	*2B1-i
WIT 184	2	56	1	499	*2B2A-i	*1B1-h
WIT 190	2	55	1	801	*2B2A-i	*2B1-i
WIT 191	1	71	1	299	*2B2A-i	*2B2A-i
WIT 193	1	70	1	208	*2B2A-i	*2B2A-i



<b>Código</b>	<b>Gênero</b>	<b>Idade</b>	<b>Etnia</b>	<b>[MASP-2] ng/ml</b>	<b>Genótipos <i>MASP2</i></b>	
WIT 196	2	55	1	578	*2B2A-i	*2B2A-i
WIT 198	1	66	1	350	*2B2A-i	*2B2A-i
WIT 199	1	59	1	339	*2B2A-i	*2B2A-i
WIT 200	2	55	1	134	*2B2A-i	*2B2A-i
WIT 204	1	84	1	660	*2B2A-i	*1B1-h
WIT 215	2	51	1	287	*2B2A-i	*2B2A-i
WIT 226	2	52	1	326	*2B2A-i	*2B2A-i
WIT 230	2	86	1	335	*2B2A-i	*2B2A-i
WIT 243	1	77	1	589	*2B2A-i	*1A
WIT 248	1	63	1	347	*2B2A-i	*2B2A-i
WIT 252	2	65	1	754	*2B2A-i	*1A
WIT 253	1	71	1	42	*2B2A-i	*2B2B-l

NOTA: [MASP-2] < 200 ng/ml = baixa; 200 - 600 ng/ml = intermediária; ≥ 600 ng/ml = alta.

## APÊNDICE 9 - REAGENTES UTILIZADOS NA PCR-SSP MULTIPLEX I

Componente	[Inicial]	[Final]	Volume (µl)
Água	-	-	7,22
Tampão Coral <sup>a</sup>	10	1	1,5
Glicerol	10%	1,5%	2,25
MgCl <sub>2</sub> (mM) <sup>a</sup>	25	0,25	0,15
dNTP (mM) <sup>a</sup>	25	0,2	0,12
TaqDNA Polimerase (U/µl) <sup>a</sup>	5	0,02	0,06
FCN1 PromAf/Gf	10	0,3	0,45
FCN1 Promr	10	0,3	0,45
FCN2 Ex8f	10	0,2	0,3
FCN2 Ex8r	10	0,2	0,3
MASP2 In8 Cf/Tf	10	0,2	0,3
MASP2 Ex10 Ar/Vr	10	0,2	0,3
MASP2 Ex3 Rf/Qf	10	0,2	0,3
MASP2 Ex3 Pr/Lr	10	0,2	0,3
DNA*	-	-	1,0
TOTAL			15

NOTA: <sup>a</sup> = Life Technologies, Carlsbad, EUA; dNTP = deoxinucleotídeo trifosfato; \* = o volume de DNA variou de 1 a 2 µl.

## APÊNDICE 10 - REAGENTES UTILIZADOS NA PCR-SSP MULTIPLEX II

Componente	[Inicial]	[Final]	Volume (µl)
Água	-	-	7,4
Tampão Coral <sup>a</sup>	10	1	1,5
Glicerol	10%	1,5%	2,25
MgCl <sub>2</sub> (mM) <sup>a</sup>	25	0,3	0,18
dNTP (mM) <sup>a</sup>	25	0,2	0,12
TaqDNA Polimerase (U/µl) <sup>a</sup>	5	0,02	0,06
MASP2 Prom Af/Cf	10	0,35	0,525
FCN2 Ex8f	10	0,08	0,12
FCN2 Ex8r	10	0,08	0,12
MASP2 In8 Cf/Tf	10	0,2	0,3
MASP2 Ex10 Yr/Dr	10	0,2	0,3
MASP2 Ex11 Hf/Rf	10	0,2	0,3
MASP2 Ex3 Pr/Lr	10	0,35	0,525
MASP2 Ex12 Cr/Tr	10	0,2	0,3
DNA*	-	-	1,0
TOTAL			15

NOTA: <sup>a</sup> = Life Technologies, Carlsbad, EUA; dNTP = deoxinucleotídeo trifosfato; \* = o volume de DNA variou de 1 a 2 µl.

# APÊNDICE 11 - REAGENTES UTILIZADOS NA PCR-SSP *p.D120G*

Componente	[Inicial]	[Final]	Volume (µl)
Água	-	-	8,25
Tampão Coral <sup>a</sup>	10	1,0	1,5
Glicerol	10%	1,5%	2,25
MgCl <sub>2</sub> (mM)	25	0,5	0,3
dNTP (mM) <sup>a</sup>	25	0,2	0,12
TaqDNA Polimerase (U/µl) <sup>a</sup>	5	0,02	0,06
MASP2 Promf	10	0,25	0,38
MASP2 Ex3 Dr/Gr	10	0,25	0,38
MBL Promf	10	0,25	0,38
MBL rev+270	10	0,25	0,38
DNA*	-	-	1,0
TOTAL			15

NOTA: <sup>a</sup> = Life Technologies, Carlsbad, EUA; dNTP = deoxinucleotídeo trifosfato; \* = o volume de DNA variou de 1 a 2 µl.

## **ANEXOS**

ANEXO 1 - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA SOCIEDADE EVANGÉLICA BENEFICENTE DE CURITIBA.....	162
ANEXO 2 - QUESTIONÁRIO APLICADO AOS FAMILIARES .....	163

ANEXO 1 - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA SOCIEDADE  
EVANGÉLICA BENEFICENTE DE CURITIBA

*Comitê de Ética em Pesquisa da Sociedade  
Evangélica Beneficente de Curitiba*

*Rua Padre Anchieta, 2770*

*80730-000 Curitiba - PR*

*Fone: 41 3240-5570*

*Fax: 41 3240-5584*

Curitiba, 13 de junho de 2008.

Thelma L. Skare  
Shirley Ramos da Rosa Uttyama

Prezada Colega,

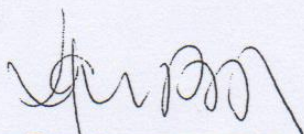
Comunicamos a V. Sa. que, em reunião ordinária do dia 12 de junho de 2008, foi aprovado o projeto de pesquisa intitulado **"INVESTIGAÇÃO DA VIA DAS LECTINAS E AUTOIMUNIDADE EM PACIENTES COM ARTRITE REUMATÓIDE E FAMILIARES"**. Protocolado neste comitê sob o número 2171/07 em 11 de abril de 2007.

Prevê a legislação que toda a documentação do projeto poderá, a qualquer momento, ser solicitada para inspeção por parte dos órgãos federais; desta forma, manterá o Comitê arquivo detalhado de cada projeto, arquivando em pasta individual o projeto inicial e relatórios de acompanhamento.

Para o projeto de V. Sa., solicitamos que dê ciência aos seus colaboradores da obrigação de, a cada seis meses a partir da data de hoje, encaminhar a este comitê relatório detalhado do andamento do projeto.

Relatórios previstos para: **20/12/2008**

Atenciosamente,



**Carmen Paredes Marcondes Ribas**  
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa da  
Sociedade Evangélica Beneficente de Curitiba

## ANEXO 2 - QUESTIONÁRIO APLICADO AOS FAMILIARES

Nome:

Tel.:

Nome do paciente com AR:

Grau de parentesco: ☐ 1º ☐ 2º

Dados demográficos:

Idade:

Gênero: ☐ F ☐ M

Estado civil:

Etnia: ☐ euro ☐ afro ☐ amer ☐ orienTabagista: ☐ S ☐ N ☐ exEtilista: ☐ S ☐ N ☐ ex

Anamnese dirigida:

Dor nas articulações: ☐ S ☐ N Se sim, quantas:  
Incha também: ☐ S ☐ N

Problemas de pele: ☐ S ☐ N Se sim, qual:

Dor de barriga/ flatulência ☐ S ☐ NDiarréia ☐ S ☐ NIntestino preso ☐ S ☐ NPerda de peso ☐ S ☐ NGanho de peso ☐ S ☐ NAmarelão na pele (icterícia) ☐ S ☐ NProblemas de fígado ☐ S ☐ NDoença de tireóide ☐ S ☐ NSonolência exagerada ☐ S ☐ NQueda de cabelo ☐ S ☐ NAnemia ☐ S ☐ N

Abortos ☐ S ☐ N Quantos: Semestre:

Osteoporose/fratura anterior ☐ S ☐ NDoenças anteriores: ☐ S ☐ NMedicamentos em uso: ☐ S ☐ N